

Synthese und Charakterisierung von Natriumionenindikatoren für die Anwendung in lebenden Zellen

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

Vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemiker Rainer Strathausen

geboren am 28.11.1985 in Heilbad Heiligenstadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Christoph Biskup, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Rainer Beckert, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der Verteidigung: 13.04.2016

„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“

Galileo Galilei

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Natriumionen und Natriumionenmessungen in der Physiologie	1
1.2	Eigenschaften eines idealen Natriumionenindikators	3
1.3	Gebräuchliche Natriumionenindikatoren	5
1.4	Ionophore für Natriumionen	7
1.4.1	Natürliche Ionophore	7
1.4.2	Kronenether	8
1.4.3	Podanden	13
1.4.4	Calixarene	13
1.4.5	Kryptanden	15
1.5	Fluorophore	17
1.6	Mechanismen der Signaltransduktion	17
1.6.1	PET (photoinduced electron transfer)	17
1.6.2	PCT (photoinduced charge transfer)	19
2	Zielstellung	20
3	Ergebnisse und Diskussion	22
3.1	Synthese von Diaza-[15]Krone-5-basierenden Natriumionenindikatoren	22
3.1.1	Synthesestrategie	22
3.1.2	Synthese des Diaza-[15]Krone-5-Ionophors 7	22
3.1.3	Kristallstrukturen des Diaza-[15]Krone-5 Ionophors und eines Diaza-[15]Krone-5-Ionophor-Natriumionen-Komplexes	23
3.1.4	Aufbau von fluoresceinähnlichen Xanthenderivaten aus Ionophor 7	25
3.1.5	Synthese von Styrylfarbstoffderivaten aus Ionophor 7	31
3.1.6	Aufbau von Rhodaminderivaten aus Ionophor 7	32
3.1.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	34
3.2	Spektroskopische Untersuchung der Diaza-[15]Krone-5-Ionophor- Farbstoffstrukturen	35
3.2.1	Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur 13	36
3.2.2	Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur 12	41
3.2.3	Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur 14	45
3.2.4	Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur 15	45
3.2.5	Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur 19	46
3.2.6	Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur 17	50
3.2.7	Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur 23	52
3.2.8	Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur 21	53
3.2.9	Diskussion	54
3.3	Synthese von [2.1.1]-basierenden Natriumindikatoren	58

3.3.1	Synthesestrategie für [2.1.1]-basierende Natriumindikatoren	58
3.3.2	Synthese von Diaza-Kronenethern	59
3.3.3	Kryptandstrategie I - Synthese einer [2.1.1]-Struktur mit funktioneller Gruppe, Hydrierung und Synthese von [2.1.1]-Farbstoff-Strukturen	60
3.3.4	Kryptandstrategie II - Synthese von N-geschützten Kryptandderivaten	69
3.3.5	Kryptandstrategie III - Synthese von [2.1.1]-basierenden Natriumionenindikatoren aus Farbstoffen mit Iminodiessigsäuregruppe	71
3.3.6	Diskussion.....	72
3.4	Spektroskopische Untersuchung der [2.1.1]-Farbstoffstrukturen.....	74
3.4.1	Untersuchung der [2.1.1]-Farbstoffstruktur 42.....	75
3.4.2	Untersuchung der [2.1.1]-Farbstoffstrukturen 64, 49, 48, 45 und 43	76
3.4.3	Diskussion.....	77
3.5	Synthese von [16]Krone-5-basierenden Natriumindikatoren.....	78
3.5.1	Synthesestrategien bei [16]Krone-5 basierenden Natriumindikatoren.....	78
3.5.2	Synthese von [16]Krone-5 basierenden Natriumindikatoren	79
3.5.3	Diskussion.....	82
3.6	Zellbiologische Untersuchungen ausgewählter Ionophor-Farbstoff-Strukturen	83
3.6.1	Zellbiologische Untersuchung der Indikatorstruktur 13	84
3.6.2	Beladung von HEK-293 und Zellen mit 12	85
3.6.3	Zellbiologische Untersuchung der Indikatorstruktur 17	86
3.6.4	Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit 19.....	89
3.6.5	Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit 14.....	90
3.6.6	Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit 15.....	91
3.6.7	Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit 23.....	91
3.6.8	Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit 42.....	92
3.6.9	Diskussion.....	93
4	Zusammenfassung und Ausblick	94
5	Experimenteller Teil.....	98
5.1	Reagenzien und Geräte.....	98
5.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel	98
5.1.2	Chromatographie	98
5.1.3	Chemische Analytik.....	98
5.1.4	UV-Vis- und Fluoreszenzspektroskopie	99
5.1.5	Mikroskopie.....	99

5.1.6	Puffer	100
5.1.7	Lösungen	100
5.1.8	Zellen.....	100
5.2	Synthese der Diaza-[15]Krone-5-Ionophors-basierenden Natriumionenindikatoren	101
5.2.1	Synthese des Diaza-[15]Krone-5-Ionophors 7	101
5.2.2	Synthese von Ionophor-7-Xanthenderivaten.....	102
5.2.3	Synthese von Ionophor-7-Syrylderivaten.....	108
5.3	Synthese der [2.1.1]-basierenden Natriumionenindikatoren.....	109
5.3.1	Synthese der Diaza-[15]Krone-5-Derivate.....	109
5.3.2	Synthese einer [2.1.1]-Struktur mit funktioneller Gruppe	112
5.3.3	Hydrierung des [2.1.1]-Derivats 34.....	116
5.3.4	Synthese der [2.1.1]-Fluoreszenzfarbstoff-Strukturen	117
5.3.5	Synthese von [2.1.1]-Farbstoff-Strukturen aus 34	120
5.3.6	Synthese der N-geschützten Kryptandderivate	121
5.3.7	Synthese der [2.1.1]-Derivaten aus Farbstoffen mit Iminodiessigsäuregruppe.....	122
5.4	Synthese der [16]Krone-5-basierenden Natriumindikatoren	125
5.5	Spektroskopische Experimente	128
5.5.1	Vorversuch zur Messung der Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz ...	128
5.5.2	Bestimmung der relativen Quantenausbeute	128
5.5.3	Bestimmung der pH- und K ⁺ -Abhängigkeit der Fluoreszenz	129
5.5.4	Bestimmung der Dissoziationskonstanten	129
5.6	Zellbiologische Experimente	129
5.6.1	Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit hergestellten Ionophor-Farbstoffstrukturen	129
5.6.2	Messung der Fluoreszenzänderung von 13 und 17 in Zellen bei inhibierter Na-K-ATPase	130
6	Literatur.....	131
7	Anhang	137
7.1	Röntgenkristallstrukturen.....	137
7.1.1	Röntgenkristallstruktur von Verbindung 7	137
7.1.2	Röntgenkristallstruktur von Verbindung 7a	139
7.1.3	Röntgenkristallstruktur von Verbindung 34.....	145
7.2	Abbildungsverzeichnis	148
7.3	Tabellenverzeichnis	152
7.4	Lebenslauf.....	153
8	Selbstständigkeitserklärung.....	155

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Å	Anström (1 Å = 100 pm)
Ar	aromatischer Rest
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DEI	direkte Elektronenstoßionisation
Diazald	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolylsulfonyl)nitrosamid
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Nährmedium
DMF	Dimethylformamid
DMP	<i>Dess-Martin-Periodan</i> , 1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1 <i>H</i>)-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Elementaranalyse
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
FAB	Fast Atom Bombardement
FCS	Fetal calf serum, Fetales Kälberserum
gem.	gemessen
GOF	Goodness of fit

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
HSAB-Konzept	H ard and S oft A cids and B ases, Konzept der Harten und Weichen Säuren und Basen
Leuko	Leuko-Farbstoff
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
m	Multiplett
M	molar
Me	Methylgruppe
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
¹³ C-NMR	Kohlenstoff-Kernresonanzspektroskopie
¹ H-NMR	Protonen-Kernresonanzspektroskopie
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCT	photoinduzierter Ladungstransfer
PET	photoinduzierter Elektronentransfer
Ph	Phenylrest
pos.	positiv
ppm	parts per million
QA	Qantenausbeute
quart.	quartär
R	Rest (allgemein)

RF	Rückfluss
RKSA	Röntgenkristallstrukturanalyse
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMA ⁺	Tetramethylammoniumion
TMACl	Tetramethylammoniumchlorid
TPMF	Triphenylmethanfarbstoff
TsOH	p-Toluolsulfonsäure
UV-Vis	Absorptionsspektroskopie

1 Einleitung

1.1 Natriumionen und Natriumionenmessungen in der Physiologie

Natriumionen spielen in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Die meisten Zellen bauen mit Hilfe der Natrium-Kalium-ATPase einen künstlichen Ionengradienten auf, indem sie die bei der Hydrolyse von ATP freiwerdende Energie nutzen, um drei Natriumionen aus der Zelle heraus und zwei Kaliumionen in die Zelle hinein zu transportieren.¹ Dies führt dazu, dass über die Zellmembran ein Natrium- und Kaliumgradient aufgebaut wird (Abb. 1). Üblicherweise liegen die intrazelluläre Natriumionenkonzentration bei 15 mM und die intrazelluläre Kaliumionenkonzentration bei 120 mM, während die Konzentrationen im Extrazellulärraum bei 145 mM bzw. 4 mM liegen.^{2, 3}

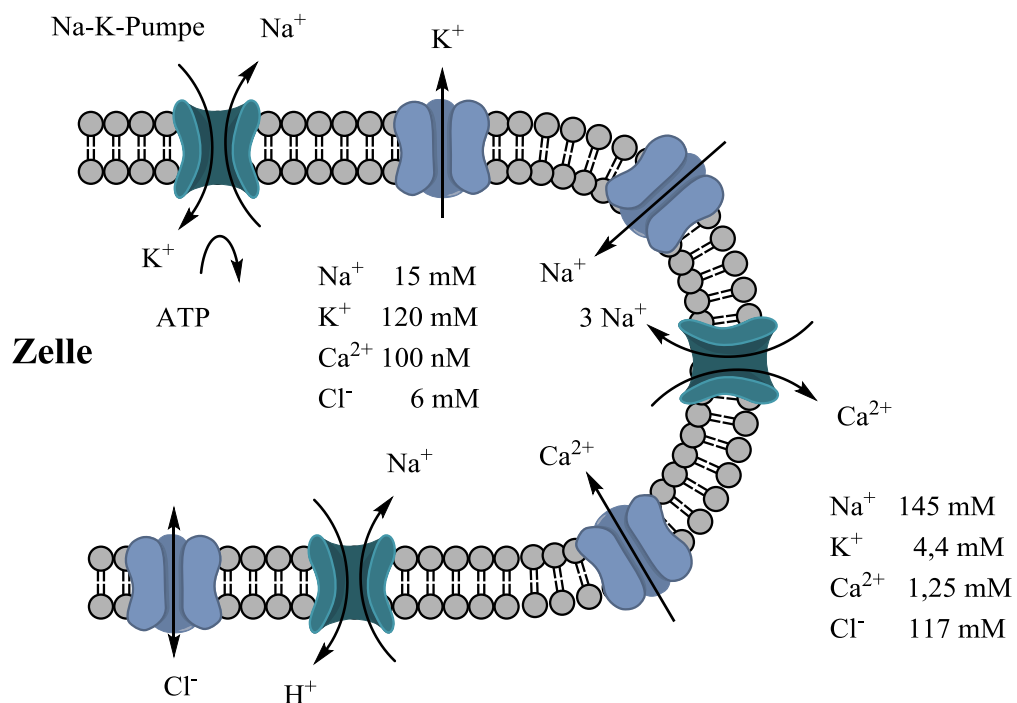


Abb. 1: Schema einer Zelle mit ausgewählten Ionenkanälen und Transportern.

Intra- und extrazelluläre Ionenkonzentrationen sind angegeben (Abbildung modifiziert nach Klink-Silbernagl).^{2, 3}

Einleitung

Aufbau und Erhalt des Natriumgradienten bedeuten einen hohen Energieaufwand für die Zelle, der aber notwendig ist, da hiermit wichtige Funktionen verknüpft sind. Der Natriumioneneinstrom durch Natriumkanäle kann eine Depolarisation der Zellmembran bewirken und damit zur Entstehung und Weiterleitung eines Aktionspotentials in Nerven- und Muskelzellen beitragen. Durch den Natriumionengradienten werden zudem zahlreiche sekundär-aktive Transportprozesse angetrieben (Abb. 1). Antiporter nutzen den Gradienten, um beispielsweise Protonen und Calciumionen durch die Membran in den extrazellulären Raum zu transportieren.^{2, 3}

Trotz der wichtigen Rolle, die Natrium- und andere Ionen in der Zelle spielen, gestaltet sich die Messung der Ionenkonzentrationen in lebenden Zellen schwierig. Techniken wie Atomabsorptionsspektrometrie, Atomemissionsspektrometrie und Elektronenstrahlmikroanalyse, erlauben zwar eine sehr genaue Bestimmung der Ionenkonzentration.⁴ Sie haben jedoch den Nachteil, dass das Gewebe bei der Messung zerstört wird. Eine Beobachtung der Veränderungen des Ionengradienten ist damit nicht möglich. Spezielle NMR-Methoden ermöglichen die Bestimmung von Ionenkonzentrationen in lebendem Gewebe, jedoch sind spezielle Shift-Reagenzien und große Gewebemengen notwendig.⁵ Alle diese Methoden, mit Ausnahme der Elektronenstrahlmikroanalyse, haben damit den Nachteil, dass sie nur die Bestimmung eines Durchschnittswertes über einen größeren Gewebebereich erlauben. Eine Messung von einzelnen Zellen ist nicht möglich. Die Beobachtung von lebenden Zellen mit hoher räumlicher Auflösung ist eine Domäne der Lichtmikroskopie. In Verbindung mit Ionenindikatoren, die in die Zelle oder das Gewebe eingebracht werden, ist es möglich die lokale Ionenkonzentration zu messen und ihren zeitlichen Verlauf zu verfolgen. Diese Indikatoren müssen speziell für das in Frage kommende Ion, also Natrium, synthetisiert werden. Leider sind im Gegensatz zu den Calcium- nur wenige Natriumindikatoren kommerziell erhältlich.⁶

Einleitung

Ein Ionenindikator für intrazelluläre Messungen besteht nach Valeur und Leray aus einem Ionophor, welches in der Lage ist das Zielion selektiv zu binden und einem Fluorophor, direkt oder über einen Abstandshalter gebunden, welches seine Fluoreszenz mit der Ionenkonzentration ändert.⁷ Zusammen bilden sie das Fluoroionophor oder den Ionenindikator (Abb. 2).

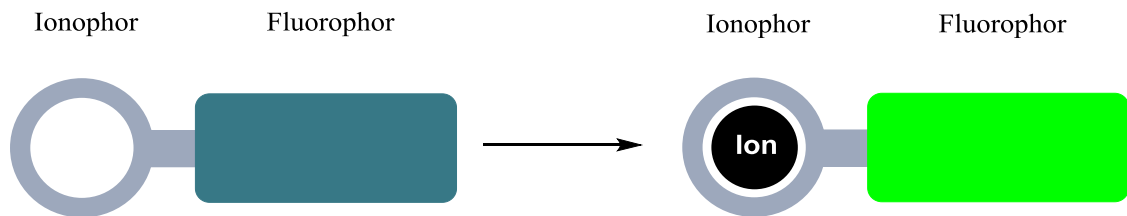


Abb. 2: Schema eines Ionenindikators bzw. eines Fluoroionophors.

Es besteht aus einem Ionophor und einem Fluorophor und zeigt eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität, oder eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums bei Bindung eines Ions.

1.2 Eigenschaften eines idealen Natriumionenindikators

Eine besonders wichtige Kenngröße für die Ionenindikatoren ist die Dissoziations- bzw. die Komplexbildungskonstante. Ion oder Analyt (A) und Indikator (I) reagieren in einer Gleichgewichtsreaktion zum Analyt-Indikator-Komplex (AI):



Damit ergibt sich für die Hinreaktion, also die Komplexbildung, die Komplexbildungs- bzw. Komplexstabilitätskonstante (K_s).

$$K_s = \frac{[AI]}{[A][I]} \quad (2)$$

Für die Rückreaktion, also die Komplexdissoziation, ergibt sich die Dissoziationskonstante (K_d).

$$K_d = \frac{[A][I]}{[AI]} \quad (3)$$

Einleitung

Damit der Indikator Änderungen in der Analytkonzentration detektieren kann, muss er bei einer Zunahme der Analytkonzentration weiteres Analyt binden und umgekehrt bei einer Abnahme der Analytkonzentration gebundenes Analyt abgeben können. Ähnlich einem Puffer gibt es also auch bei einem Indikator einen optimalen Arbeitsbereich, der dann erreicht ist, wenn die Konzentration des freien Indikators gleich der Konzentration der Analyt-gebundenen Form ist. Mit $[I] = [AI]$ erhält man:

$$K_d = [A] \quad (4)$$

Die Dissoziationskonstante des Indikators sollte also stets im Bereich der zu erwartenden Analytkonzentration liegen. Wegen dieses Zusammenhangs wird in der Literatur, die mehr auf die Anwendung der Ionenindikatoren fokussiert, die Dissoziationskonstante verwendet. Bei Publikationen über Ionophore sind meist Komplexstabilitätskonstanten oder ihre Logarithmen zu finden. Auf Grund des reziproken Zusammenhangs lassen sie sich leicht ineinander umrechnen:

$$K_d = \frac{1}{K_s} \text{ bzw. } pK_d = -\lg K_d = \lg K_s \quad (5)$$

Eine weitere wichtige Größe ist die Selektivität (S). Sie gibt an, wie gut ein Indikator den Analyten im Verhältnis zu Störionen (SI) bindet.

$$S(A) = \frac{K_d(SI)}{K_d(A)} = \frac{K_s(A)}{K_s(SI)} \quad (6)$$

Ein idealer Natriumindikator sollte nach Minta und Tsien⁸ einige wesentliche Eigenschaften aufweisen:

1. Damit die Funktion der Zelle nicht beeinträchtigt wird, muss der Indikator die Natriumionenkonzentration messen, ohne mit anderen Molekülen der Zelle zu wechselwirken.
2. Der Indikator sollte eine hohe Selektivität für Natriumionen haben, d.h. er sollte andere Ionen, die in der Zelle vorkommen, nicht binden. Da die Kaliumionenkonzentration die Natriumionenkonzentration in Zellen um das

Zehn bis Vierzehnfache übersteigt, ist eine besonders hohe Selektivität für Natriumionen in Gegenwart von Kaliumionen wichtig.

3. Der Indikator sollte genug polare Gruppen haben, um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen und um eine Diffusion durch die Zellmembran zu verhindern.
4. Die Dissoziationskonstante (K_d) sollte in Wasser bei pH 7,4 im Bereich von 5 - 50 mM liegen. Nur in diesem Bereich führt die Änderung der Natriumionenkonzentration zu einer Änderung der Indikatorfluoreszenz. Ist der K_d -Wert zu groß, dann findet keine Bindung statt. Änderungen der Analytkonzentration können folglich nicht detektiert werden. Ist der K_d -Wert zu niedrig, dann ist der Indikator gesättigt. Eine Änderung der Natriumionenkonzentration führt dann ebenfalls nicht zu einer Änderung des Signals.
5. Um die Probe zu schonen, sollten die Quantenausbeute (Φ) und der Extinktionskoeffizient (ϵ) groß genug sein, damit auch bei einer geringen Anregungsintensität ein Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Ein gutes Maß für die „Helligkeit“ (Brightness) eines Fluorophors ist das Produkt aus beiden Größen ($\Phi \cdot \epsilon$).
6. Die Anregung sollte über 340 nm erfolgen können, da bei einer geringeren Wellenlänge Quarzgefäße oder Quarzoptiken für die Messungen notwendig sind. Nukleinsäuren und aromatische Aminosäuren absorbieren unter 340 nm, und es kann dadurch zu einer Schädigung der Zellen kommen.
7. Die Emission sollte über 500 nm liegen, um ein Überlappen mit der Autofluoreszenz der Zellen zu vermeiden.

1.3 Gebräuchliche Natriumionenindikatoren

Der erste einer breiten Anwendung zugeführte Natriumindikator, das SBFI (sodium-binding benzofuranisophthalate), wurde von Minta und Tsien vorgestellt.⁸ SBFI erlaubt unter dem Fluoreszenzmikroskop die Messung der Natriumionenkonzentration in lebenden Zellen. Es hat allerdings den Nachteil, dass es in dem gleichen Bereich angeregt wird und emittiert wie die Autofluoreszenz der Zelle. Bei Messungen, in deren Verlauf sich die Autofluoreszenz ändert, kann dieser Indikator also nicht eingesetzt werden. Später stellten Kuhn et al. Sodium Green,⁹ Gee et al. CoroNa Red und CoroNa

Einleitung

Green¹⁰⁻¹² und Minta et al. das Asante NaTRIUM Green 1 - 2 vor (Abb. 3).¹³ CoroNa Red, CoroNa Green und Asante NaTRIUM Green 1 haben jedoch einen K_d -Wert, der außerhalb des physiologischen Bereiches liegt. Beim Sodium Green und Asante NaTRIUM Green 2 liegen Absorptions-, Emissions- und K_d -Werte in einem günstigen Bereich, allerdings zeigen beide eine relativ geringe Selektivität für Natrium in Gegenwart von Kalium.

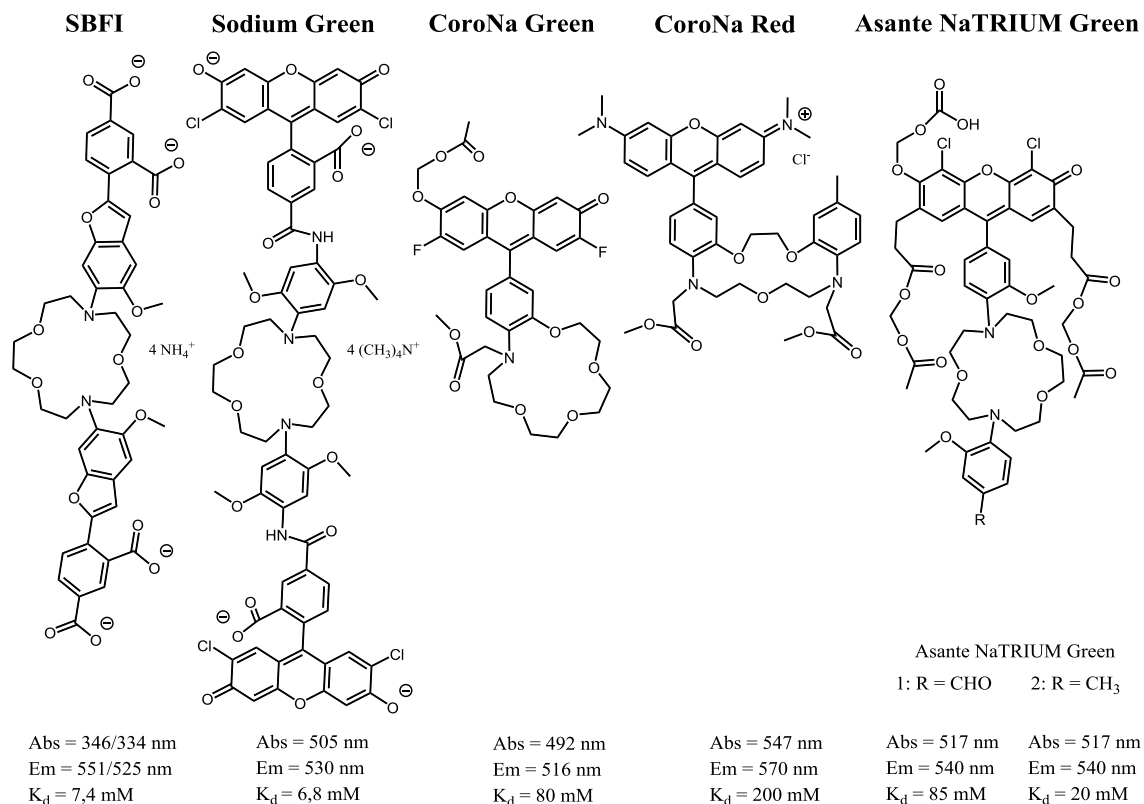


Abb. 3: Vergleich der Natriumionenindikatoren SBFI, Sodium Green, CoroNa Green, CoroNa Red, Asante NaTRIUM Green 1 und 2 für intrazelluläre Messungen.

Mit Angabe von Absorptions-, Emissionsmaxima sowie Dissoziationskonstanten.^{8-11, 13}

Die drei Indikatoren mit den besten Eigenschaften für intrazelluläre Natriummessungen sind damit SBFI, Sodium Green und Asante NaTRIUM Green 2. Alle drei haben die gleiche Grundstruktur. Das Ionophor ist ein Diaza-[15]Krone-5 Kronenether mit an beiden Stickstoffatomen gebundenen aromatischen Ringen, die in *ortho*-Position eine Methoxygruppe aufweisen. Das Fluorophor ist beim SBFI ein Benzofuran-, beim Sodium Green ein Chlorfluorescein- und beim Asante NaTRIUM Green 2 ein Fluorescein-ähnliches Xanthenderivat.

Da die Selektivität für Natriumionen eine der wichtigsten Bedingungen ist, um in lebenden Zellen die Natriumionenkonzentration in Gegenwart einer viel höheren Kaliumionenkonzentration zu messen, muss der Optimierung der Grundstruktur, oder der Synthese einer neuen Grundstruktur mit deutlich höherer Selektivität, eine hohe Bedeutung beigemessen werden.

1.4 Ionophore für Natriumionen

Die Bindung von Natriumionen gestaltet sich schwieriger, als es auf den ersten Blick scheint. Natrium gehört zu den Alkalimetallen, d.h. es liegt in der Natur nur als einwertiges Ion vor und geht Bindungen mit organischen Molekülen meist nur in Form von Salzen ein. Chelatliganden erlauben es, die meisten Haupt- und Nebengruppenmetallionen zu binden. Bei den Alkalimetallen ist dies deutlich schwieriger.

1.4.1 Natürliche Ionophore

In der Natur entstanden verschiedene Moleküle, die in der Lage sind, Alkali- und Erdalkalimetalle zu komplexieren (Abb. 5). Porphyrine können beispielsweise Magnesium- (Chlorophyll) und Eisenionen (Hämoglobin) binden. Nonactin kann Natrium- und Valinomycin kann Kaliumionen mit einer hohen Selektivität komplexieren.¹⁴

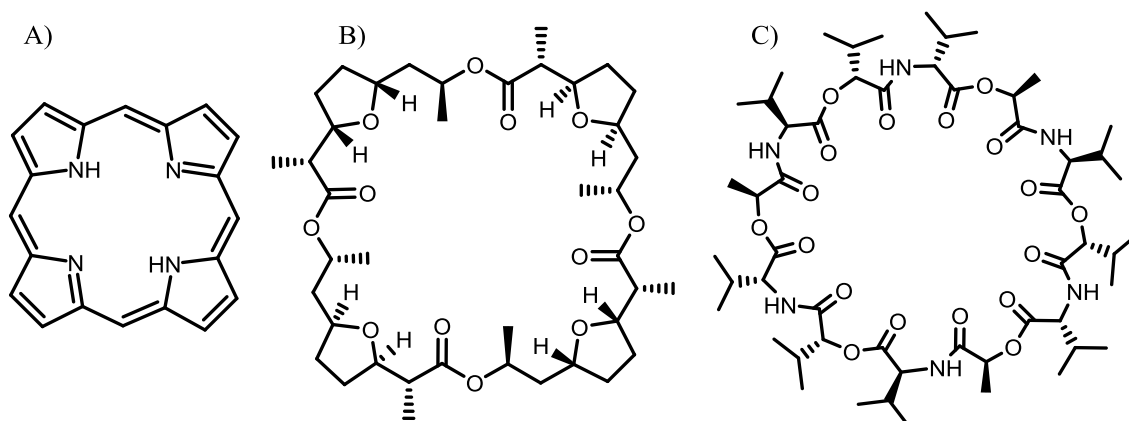


Abb. 4: Strukturen natürlicher Ionophore.

A) Porphyrin, B) Nonactin und C) Valinomycin (Abbildung modifiziert nach Vögtle).¹⁵

1.4.2 Kronenether

Synthetische Na^+ -Ionophore wurden erstmals im Jahre 1967 von Pedersen beschrieben. Er entdeckte eine neue Substanzklasse, die Kronenether.¹⁶ Wie so vieles in der Chemie war auch diese Entdeckung ein Zufall. Pedersen wollte Bis[2-(o-hydroxyphenoxy)ethyl]ether aus einem einfach geschützten Brenzkatechin und Bis(2-chloroethyl)ether gewinnen. Da das Brenzkatechin nicht vollständig geschützt war, erhielt er als Nebenprodukt eine kleine Menge eines weißen kristallinen Feststoffs, der Kaliumpermanganat in Benzen und andere Salze in organischen Lösungsmitteln lösen konnte (Abb. 5). Es handelte sich um Dibenzo[18]Krone-6, welches Komplexe mit vielen Alkalisalzen bilden kann.

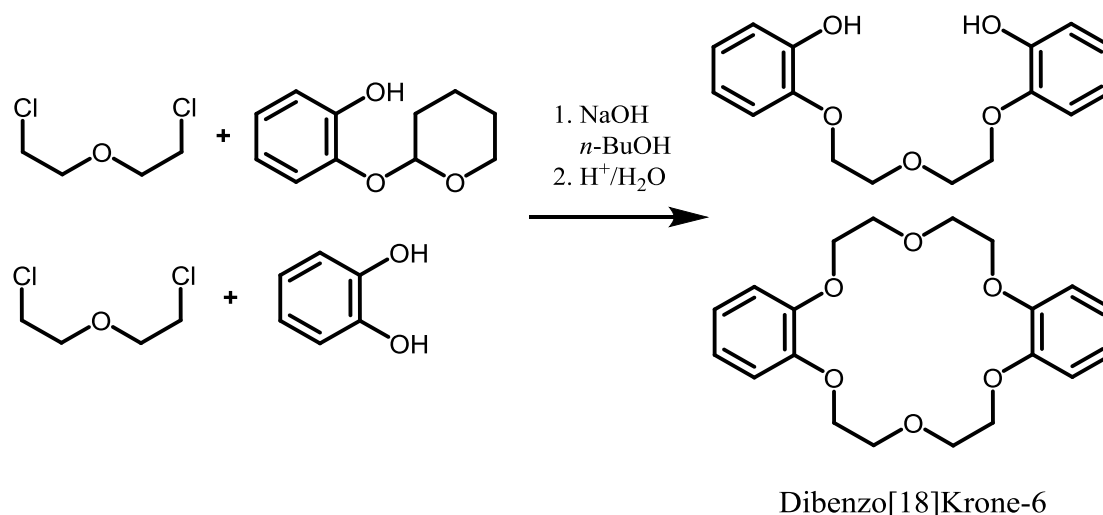


Abb. 5: Erste Synthese eines Kronenethers.

Die Reaktion von geschütztem Brenzkatechin, mit einer Verunreinigung an freiem Katechin, mit Bis(2-chloroethyl)ether lieferte als Nebenprodukt Dibenzo[18]Krone-6.

Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den biologischen Ionophoren (Abb. 4) und dem chemischen Ionophor (Abb. 5) ist offensichtlich. Durch die zyklische Struktur mit Heteroatomen sind sie in der Lage, Alkaliionen zu binden. Pedersen erhielt für seine Entdeckung der Kronenether 1987 den Chemie-Nobelpreis. Streng genommen, werden nur sauerstoffhaltige Cyclen als Kronenether bezeichnet, allgemein werden solche cyclischen Verbindungen Coronanden genannt. Sind auch andere Heteroatome, wie z.B. Stickstoff, in der Ringstruktur vertreten, nennt man sie Azacoronanden oder Azakronenether. Da die Benennung der Moleküle nach IUPAC-Nomenklatur sehr aufwendig ist, entwickelte Pedersen für die Kronenether eine neue Nomenklatur. Es wird zuerst die Anzahl der Atome im Ring in eckigen Klammern, dann die

Einleitung

Familienbezeichnung „Krone“ und zuletzt die Zahl der Donoratome angegeben. Ankondensierte Ringe aber auch die Art und Anzahl anderer Heteroatome, sowie daran gebundene Gruppen werden vorangestellt. Auch andere Bezeichnungen und Akronyme wie „18C6“ sind geläufig.

Die neue Substanzklasse besteht aus sich wiederholenden Ethylenoxy-Einheiten ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$) und ähnelt damit strukturell den biologischen Ionophoren (Abb. 4). Diese Struktur bringt einige sehr interessante Eigenschaften mit sich. Die Polarität ist durch das gleiche Verhältnis von Ethylen zu Sauerstoff sehr ausgeglichen, d.h. die Kronenether sind sowohl in hydrophilen als auch in lipophilen Lösungsmitteln löslich. Je nach Polarität des Lösungsmittels ist jedoch die Konformation unterschiedlich (Abb. 6). In hydrophilen Lösungsmitteln ist der Sauerstoff nach außen und die Ethyleneinheit nach innen gerichtet, in lipophilen Lösungsmitteln ist es umgekehrt.¹⁵

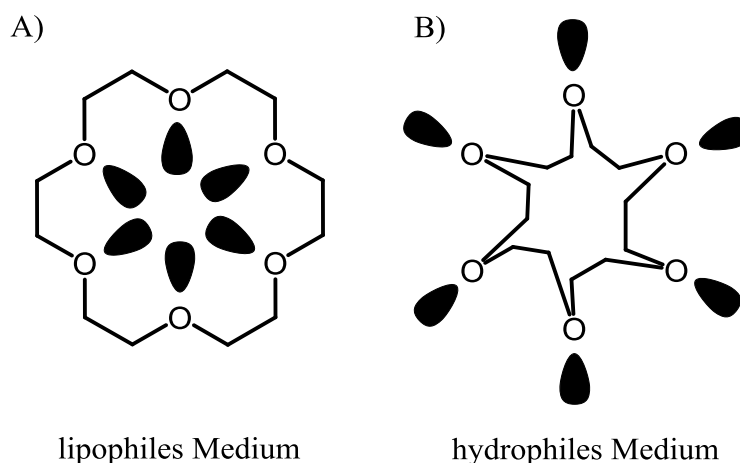


Abb. 6: Lösungsmitte labhängigkeit der [18]Krone-6 Struktur.

A) Konformation des Kronenethers in einem lipophilen Lösungsmittel. B) Konformation des Kronenethers in einem hydrophilen Lösungsmittel (Abbildung modifiziert nach Vögtle).¹⁵

Insgesamt gibt es eine enorme Vielfalt an Strukturen, die durch die verschiedenen Ringgrößen, aber auch durch die Derivatisierung bedingt ist. Neben Sauerstoff finden auch andere Heteroatome Verwendung, häufig Stickstoff,¹⁷ selten auch Schwefel¹⁸ und Arsen.¹⁹ Hierbei gilt für die Stärke der Bindung des Ions das **Hard and Soft Acids and Bases (HSAB)** Konzept, d.h. harte Kationen wie Lithium-, Natrium- und Kaliumionen bevorzugen harte Donoratome wie Sauerstoff und Stickstoff, während sehr weiche Kationen wie Silberionen weiche Donoratome wie Schwefel bevorzugen.²⁰

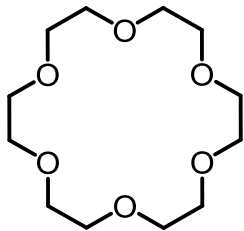
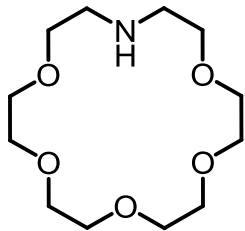
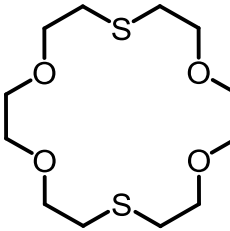
			
$\lg K_s \text{ K}^+ (\text{MeOH})$	6,1	3,9	1,15
$\lg K_s \text{ Ag}^+ (\text{H}_2\text{O})$	1,6	3,3	4,34

Abb. 7: Einfluss verschiedener Donoratome in [18]Krone-6 auf die Komplexbildungskonstanten mit Kalium- und Silberionen.

Angegeben ist der dekadische Logarithmus der Komplexbildungskonstante der Ionen mit den jeweiligen Coronanden in den Lösungsmitteln H_2O und MeOH (Abbildung modifiziert nach Vögtle).¹⁵

Ein weiteres wichtiges Kriterium für eine Bindung zwischen Ion und Molekül ist die Größe des Rings. Das Ion muss „passen“, der Ionenradius sollte in etwa mit dem Innenraum des Kronenethers übereinstimmen (Abb. 8).

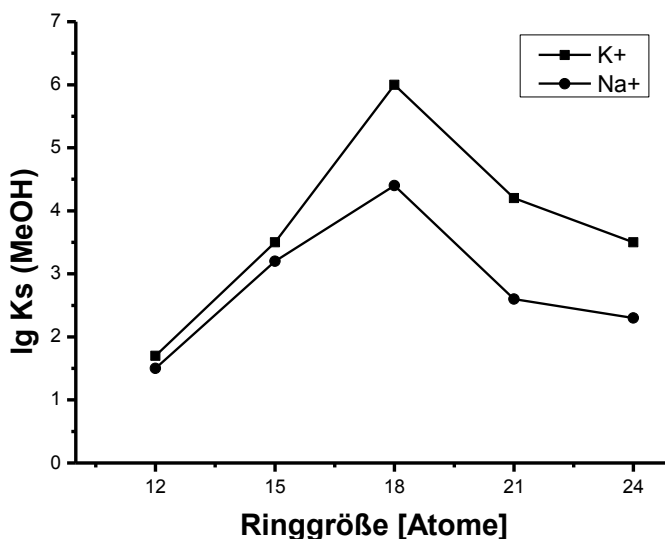


Abb. 8: Dekadischer Logarithmus der Komplexbildungskonstanten von Na^+ und K^+ mit Kronenethern verschiedener Ringgröße (Abbildung modifiziert nach Steed und Atwood).²¹

Dadurch ergibt sich eine gewisse Selektivität. So zeigt das Kaliumion die größte Komplexbildungskonstante bei [18]Krone-6 mit einer hohen Selektivität gegenüber Natriumionen. Auch bei Natriumionen ergibt sich für [18]Krone-6 die größte Komplexbildungskonstante. Da jedoch auch Kaliumionen entsprechend gut gebunden werden, ist die Selektivität gering. Für die [15]Krone-5-Struktur ergibt sich ein

Einleitung

ähnliches Bild. Auch hier ist die Komplexbildungskonstante mit Kaliumionen größer, die von Natriumionen liegt jedoch in der gleichen Größenordnung.

Die Erwartung, dass Ionen und Kronenether, deren Ionenradien und Hohlraum sich ähneln, die größten Komplexbildungskonstanten und Selektivitäten aufweisen (Tab. 1), trifft nicht zu. Stimmen die Größe des Ions und des Kronenethers nicht überein, können sie auch in anderen Mengenverhältnissen binden. So können große Ionen Sandwichkomplexe mit zwei Kronenethermolekülen bilden, während zwei kleine Ionen auch von einem großen Kronenethermolekül gebunden werden können.

Tab. 1: Vergleich der Ionendurchmesser und Innendurchmesser ausgewählter Kronenether (nach Steed und Atwood).²¹

Kation	Durchmesser [Å]	Kronenether	Innendurchmesser [Å]
Li⁺	1,36	[12]Krone-4	1,2 – 1,5
Na⁺	1,9	[15]Krone-5	1,7 – 2,2
K⁺	2,66	[18]Krone-6	2,6 – 3,2
Cs⁺	3,38	[21]Krone-7	3,4 – 4,3

Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aus dem verwendeten Lösungsmittel. Die meisten Tabellenwerte der Stabilitätskonstanten, die verfügbar sind, wurden in Methanol oder anderen organischen Lösungsmitteln bestimmt.²⁰ Dadurch ergeben sich meist hohe Komplexbindungskonstanten und eine recht hohe Selektivität. In Wasser trifft dies nicht zu. Die Selektivitäten bleiben ähnlich, aber die Komplexbindungskonstante sinkt dramatisch. Vergleicht man die Daten für [15]Krone-5 und Natriumionen in Methanol ($\lg K_s = 3,3$) und Wasser ($\lg K_s = 0,8$) erkennt man, dass die Komplexbindungskonstante von Methanol zu Wasser um das über 300fache sinkt.²² Diese Änderung der Komplexbildungskonstante, mit dem Wechsel des Lösungsmittels lässt sich zum einen durch die oben beschriebene Konformationsänderung der Kronenether erklären. In Wasser sind die polaren Gruppen nach außen gerichtet (Abb. 6). Um das Ion zu komplexieren, muss das Molekül die Konformation so ändern, dass die polaren Gruppen nach innen gerichtet sind. Eine Komplexierung des Ions ist damit erschwert. In lipophilen Medien sind die unpolaren Gruppen nach außen und die polaren Gruppen nach innen gerichtet, so dass das Molekül bereits in der Konformation vorliegt, die für die Ionenbindung erforderlich ist. Zum anderen solvatisieren unterschiedliche Medien die Ionen unterschiedlich stark. Wasser bildet sehr starke Hydrathüllen mit Ionen, besonders mit harten Alkalimetallionen. Die Stabilität des

Einleitung

Komplexes wird damit durch die Differenz der Bindungsenthalpie des Kronenethers und der Solvatisierungsenthalpie des Ions im Wasser bestimmt. Kalium, dessen Hydrathülle schwächer gebunden ist, hat eine geringere Hydratationsenthalpie. Kalium-Komplexe haben auch aus diesem Grunde in Wasser eine größere Stabilität.

Da Kronenether, besonders in Wasser, nur eine geringe Komplexstabilität und Selektivität aufweisen, ist es für die Synthese eines sensitiven und selektiven Natriumionenindikators erforderlich, die Komplexstabilität und Selektivität zu erhöhen. Eine Strategie ist die Substitution zweier Sauerstoffatome des Ringes mit Stickstoff und die Einführung von Seitengruppen, die das Natriumion zusätzlich komplexieren und damit die Komplexstabilität und Selektivität erhöhen. Solch eine optimierte Grundstruktur wurde von Minta und Tsien⁸ vorgestellt und später von anderen in weiteren Synthesen übernommen.^{9, 13, 23} Eine weitere Strategie ist die Ringerweiterung. Bei einer Ringerweiterung von einer [15]Krone-5-Struktur zu einer [16]Krone-5-Struktur erhöhen sich Komplexstabilität und Selektivität für das Natriumion (Abb. 9).

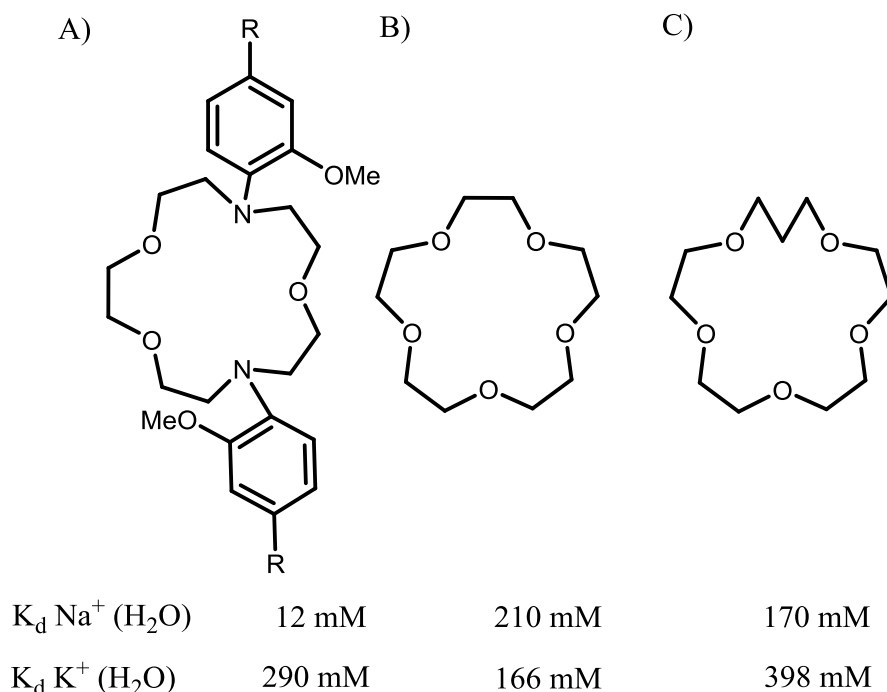


Abb. 9: Strukturen und in Wasser gemessene Dissoziationskonstanten einiger Kronenetherstrukturen für Natrium- und Kaliumionen.

A) Natriumionophor nach Minta und Tsien,⁸ B) [15]Krone-5^{20, 24} C) [16]Krone-5.²⁵

Einleitung

Von Suzuki et al.²⁶ wurde diese Strategie konsequent verfolgt und in Richtung hochnatriumselektive Ionophore zur Anwendung in natriumselektiven Elektroden optimiert. Indem sie in [16]Krone-5 große Seitengruppen einführten, die nur genau passenden Ionen eine Bindung erlaubten, konnten sie die Natrium-Kalium-Selektivität um das ca. 300fache steigern (Abb. 10).

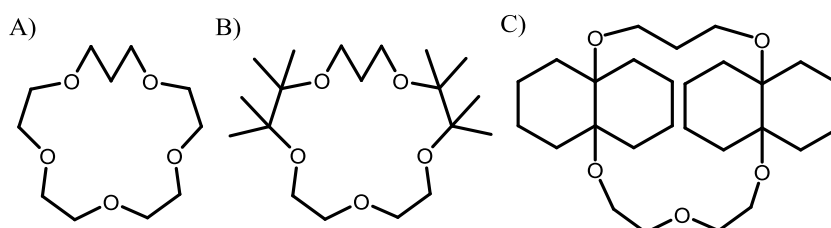


Abb. 10: Strukturen der [16]Krone-5 Derivate nach Suzuki mit unterschiedlichen Natrium-Kalium-Selektivitäten.

Für [16]Krone-5 A) beträgt die Natrium-Kalium-Selektivität 0,4. Für das Octamethylderivat B) 130 und für das Tetracyclohexylderivat C) 300.²⁶

1.4.3 Podanden

Neben den ringförmigen Kronenethern oder Coronanden gibt es auch offenkettige Strukturen, die als Podanden bezeichnet werden. Sie sind schon sehr lange bekannt, da sie synthetisch relativ leicht zugänglich sind. Sie werden in Form des Methylesters (Glyme) als Lösungsmittel verwendet. Doch erst seit der Entdeckung der Coronanden wurden die Podanden gezielt hergestellt, derivatisiert und genauer erforscht. Auf Grund der offenkettigen Struktur weisen sie eine sehr geringe Komplexstabilität und praktisch keine Selektivität auf.

1.4.4 Calixarene

Eine weitere Grundstruktur, die schon länger bekannt und in der Lage ist, Alkaliionen zu komplexieren, sind die Calixarene. Ihren Namen erhielten die Calixarene von Gutsche auf Grund ihrer kelchartigen Struktur.²⁷ Das Wort „calix“ kommt aus dem Lateinischen und bedeutet Kelch, „aren“ zeigt an, dass aromatische Gruppen in der Struktur vorhanden sind.

Einleitung

Gutsche entwickelte eine einfache Nomenklatur, die eine genauere Beschreibung erlaubt. Der Wortteil vor „calix“ beschreibt den Substituenten am Aromaten und die Zahl in eckigen Klammern zeigt an, wie viel Glieder der Ring hat. Die Struktur in Abb. 11 würde nach dieser Nomenklatur als R-Calix[4]aren bezeichnet werden.

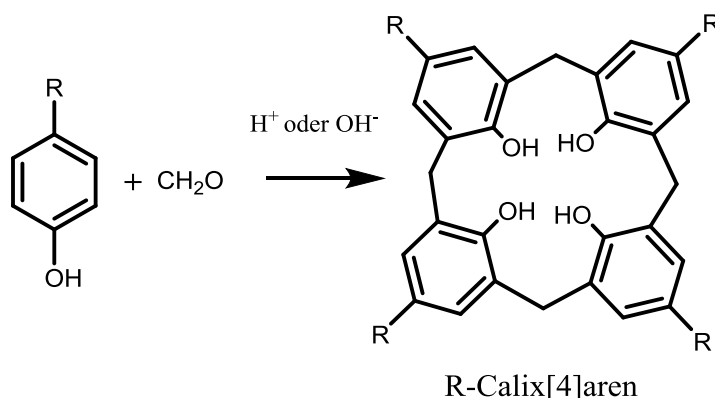


Abb. 11: Allgemeine Synthese der Calixarene aus Phenolderivaten und Formaldehyd.

Die Calixarene sind, durch säure- und basenkatalysierte Kondensation von Phenolen mit Formaldehyd synthetisch leicht zugänglich (Abb. 11). Adolf von Baeyer erhitzte 1872 zum ersten Mal Phenol mit wässriger Formaldehydlösung und erhielt dabei ein harziges nicht kristallines Produkt.²⁸ Da zu der damaligen Zeit die technischen Voraussetzungen fehlten, um das Produkt genauer zu analysieren, blieb die Struktur unbekannt. Erst 1981 konnte Gutsche zeigen, dass bei der Kondensation ein Gemisch aus Cyclooligomeren mit verschiedenen Ringgrößen entsteht.²⁹ Die Calixarene weisen alle sehr hohe Schmelzpunkte auf. Eine weitere Eigenschaft, die auch schon von Zinke³⁰ beobachtet wurde, ist die Unlöslichkeit in Wasser und die geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln.^{15, 27} Dies erschwert nicht nur die Analyse der Calixarene, sondern schränkt auch ihre Anwendung deutlich ein. Durch Verethern oder Verestern der phenolischen Hydroxygruppe kann die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln verbessert und der Schmelzpunkt herabgesetzt werden.

Von Nishimura et al. wurde ein calixarenbasierter Natriumindikator vorgestellt, der allerdings wasserunlöslich ist und einen zu geringen K_d -Wert aufweist.³¹ Insgesamt haben sich die Calixarene trotz ihrer interessanten Eigenschaften und ihrer relativ einfachen synthetischen Zugänglichkeit nicht als neue Ionophore für Natriumionenindikatoren bewährt. Zum einen entsteht trotz der einfachen Synthese eine Vielzahl von Cyclooligomeren als Nebenprodukte, die sich nur sehr schlecht voneinander trennen lassen. Zum anderen sind sie in fast allen Lösungsmitteln wenig löslich bis unlöslich.

1.4.5 Kryptanden

Die jüngste Gruppe der Ionophore sind die Kryptanden, die Anfang der siebziger Jahre von Lehn an der Universität Straßburg, durch Verbrücken von Azacoronanden, entwickelt wurden.³² Für diese Entdeckung erhielt Lehn 1987 zusammen mit Pedersen und Cram den Nobelpreis für Chemie. Da die Benennung der Moleküle nach IUPAC-Nomenklatur sehr aufwendig ist, entwickelte Lehn für die Kryptanden eine neue Nomenklatur. In eckigen Klammern wird die Anzahl der Sauerstoffatome einer Brücke durch Punkte getrennt geschrieben (Abb. 12).

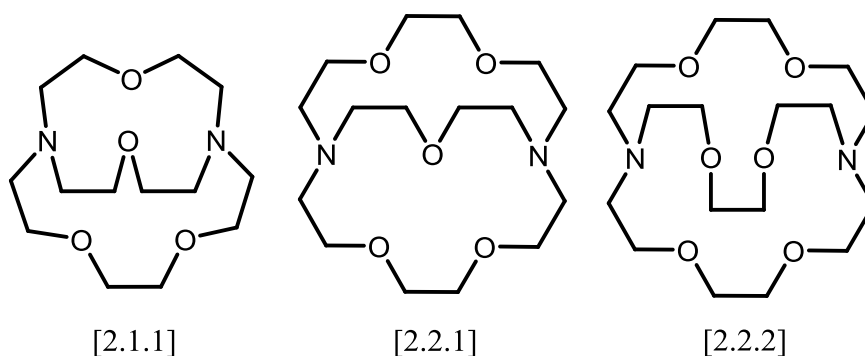


Abb. 12: Verschiedene Kryptanden mit Nomenklatur.

Vergleicht man nun die Coronanden und Kryptanden, stellt man einige interessante Unterschiede und Gemeinsamkeiten fest. Die Donoratome haben ähnliche Effekte wie bei den Coronanden, d.h. es gilt auch hier das HSAB-Konzept, Ionen wie Natrium und auch Kalium bevorzugen harte Donoratome wie Sauerstoff und Stickstoff. Auch die Kryptanden treten in Konkurrenz zur stark ausgeprägten Hydrathülle der Alkaliionen in Wasser, was den starken Unterschied zwischen den Komplexstabilitätskonstanten in Wasser und organischen Lösungsmitteln erklärt. Auf Grund ihrer sphärischen Struktur

Einleitung

sind die Kryptanden sehr starr und haben dadurch eine hohe Selektivität für Ionen, die in den Innenraum passen, und diskriminieren durch diese topologische Kontrolle sehr gut größere aber auch kleinere Ionen. Abb. 13 zeigt, dass die Komplexstabilitätskonstanten im Vergleich zu den Kronenethern deutlich größer sind.

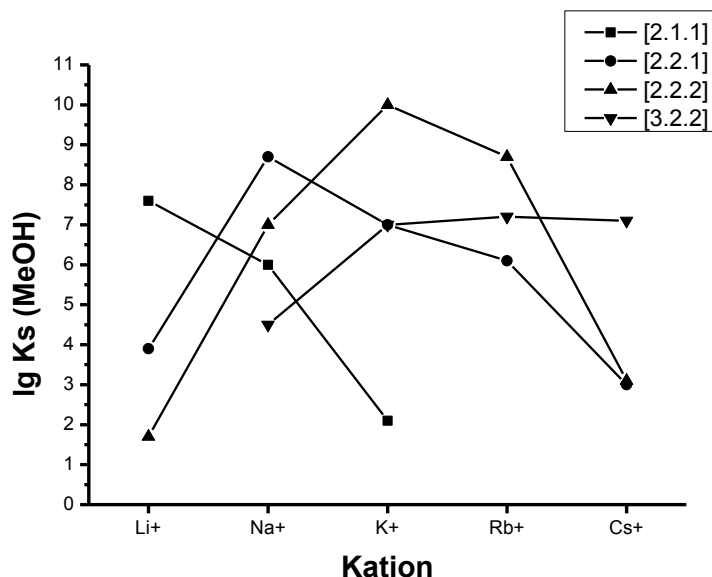


Abb. 13: Darstellung der Komplexstabilitätskonstanten verschiedener Kryptanden mit verschiedenen Alkaliionen (Abbildung modifiziert nach Steed und Atwood).²¹

Für das Natriumion weist [2.2.1] die größte Komplexstabilität auf, gefolgt vom [2.2.2] und [2.1.1]. Das Kaliumion bildet mit [2.2.2] den stabilsten Komplex gefolgt von [2.2.1] und [2.1.1]. Somit kommen [2.2.1] und [2.1.1] als Grundlage für ein neues natriumselektives Ionophor in Frage. Da [2.1.1] die größte Selektivität für Natriumionen in Gegenwart von Kaliumionen und eine etwas geringere Komplexstabilität aufweist, ist es am besten zur Entwicklung neuer natriumsensitiver Indikatoren geeignet. Geeignete Ionophore müssen eine Dissoziationskonstante von ca. 10 mM aufweisen, was einer Komplexstabilitätskonstanten von 100 M^{-1} bzw. einem $\lg K_s = 2$ entspricht. Für eine Anwendung als Natriumindikator sollten die $\lg K_s$ Werte der Ionophore jedoch nicht zu groß sein. Es ist allerdings zu beachten, dass die in der Literatur verfügbaren Daten fast ausschließlich in Methanol oder anderen organischen Lösungsmitteln gemessen wurden und somit von dem in Wasser geltenden Wert für die Komplexstabilität um mindestens den Faktor einhundert bzw. $\lg K = 2$ abweichen.

1.5 Fluorophore

Der zweite wichtige Bestandteil eines Indikators ist das Fluorophor, dessen Fluoreszenzeigenschaften durch die Bindung des Analyts geändert werden. Ein Fluorophor besteht wie ein normaler Farbstoff aus einem System konjugierter π -Elektronen, in dem auch verschiedene Heteroatome wie Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel eingebaut sein können. Donor- und Akzeptorgruppen erweitern das π -System und haben Einfluss auf Absorption und Fluoreszenz. Im Unterschied zu normalen Farbstoffen müssen bei Fluoreszenzfarbstoffen die strahlungslosen Übergänge vermieden werden, um eine möglichst große Quantenausbeute zu erzielen. Bedingung hierfür ist eine starre Struktur. Prinzipiell kommen eine Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen für den Einsatz in Ionenindikatoren in Frage, so werden z.B. Benzofuran beim SBFI,⁸ Xanthenderivate beim Sodium Green,⁹ CoroNa Green¹⁰ und beim Asante NaTRIUM Green,¹³ Anthracenderivate,³³ Coumarinderivate³⁴ und Polymethin- bzw. Styrylderivate³⁵ eingesetzt. Xanthenfarbstoffe haben sich für diese Aufgabe besonders bewährt. In den meisten Indikatoren werden Fluoresceinderivate oder Rhodamine eingesetzt. Sie bieten, ähnlich wie die Styrylfarbstoffe einige Vorteile: Sie sind relativ ungiftig, ihre Absorption und Fluoreszenz liegt in einem günstigen Wellenlängenbereich und sie sind oft wasserlöslich. Die Styrylfarbstoffe sind zudem synthetisch relativ leicht zugänglich.

1.6 Mechanismen der Signaltransduktion

Um mit Hilfe eines Fluoroionophors eine Ionenkonzentration zu messen, müssen Ionophor und Fluorophor so verbunden sein, dass eine Änderung der Ionenkonzentration zu einer Änderung der Fluoreszenz führt. Um dies zu bewerkstelligen, finden zwei Prinzipien Anwendung, der photoinduzierte Elektronentransfer (photoinduced electron transfer, PET) und der photoinduzierte Ladungstransfer (photoinduced charge transfer, PCT).⁷

1.6.1 PET (photoinduced electron transfer)

Bei Indikatoren, deren Signaltransduktion auf PET basiert, ist das Fluorophor über einen Abstandshalter mit einer Donorgruppe im Ionophor verbunden. Der Donor im

Einleitung

freien Ionophor löscht die Fluoreszenz des Fluorophors, da die Energie des höchsten besetzten Molekülorbital des Donors (highest occupied molecule orbital, HOMO) über dem des Fluorophors liegt und ein Übergang vom HOMO des Donors zum HOMO des Fluorophors stattfinden kann. Die Rückkehr des Elektrons aus dem angeregten Zustand (lowest unoccupied molecule orbital, LUMO) in den Grundzustand (HOMO des Fluorophors) wird dadurch verhindert (Abb. 14). Ist ein Ion im Ionophor gebunden, wird die Energie des HOMO infolge der Bindung abgesenkt. Elektronen sind dann nicht mehr in der Lage, die Fluoreszenz zu löschen (Abb. 14). Mit steigender Ionenkonzentration ist somit eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität zu beobachten.^{7, 36} Es sind eine Vielzahl an Ionenindikatoren bekannt, die nach dem PET-Prinzip arbeiten, wie z.B. Sodium Green oder Asante NaTRIUM Green.^{9, 13}

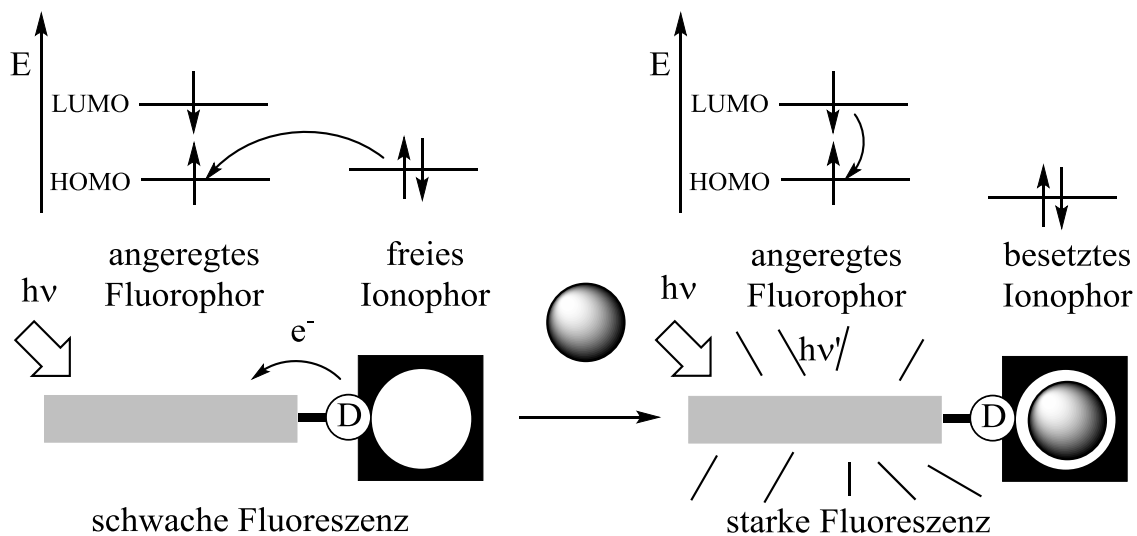


Abb. 14: Prinzip und Funktionsweise des PET-Mechanismus (Abbildung modifiziert nach Valeur und Leray).⁷

1.6.2 PCT (photoinduced charge transfer)

Bei Anregung eines Fluorophors wird ein Elektron von der Donor- zur Akzeptorgruppe verschoben. Beim PCT ist das Ionophor direkt mit dem Donor-Akzeptorsystem des Fluorophors verbunden. Ionen, die am Ionophor und damit am Donor oder Akzeptor binden, beeinflussen den PCT. Bindet ein Kation am Donor, wird der Grundzustand stabilisiert, es ist mehr Energie nötig für die Anregung, d.h. auch die Fluoreszenz hat eine höhere Energie und erfährt eine Blauverschiebung (Abb. 15). Ist das Ionophor am Akzeptor gebunden und ein Kation bindet daran, wird der angeregte Zustand stabilisiert, d.h. es wird weniger Energie für die Anregung benötigt und damit kommt es zu einer Rotverschiebung der Fluoreszenz (Abb. 15).^{7, 36} Ein Ionenindikator, der nach dem PCT Prinzip arbeitet, ist das SBFI.⁸

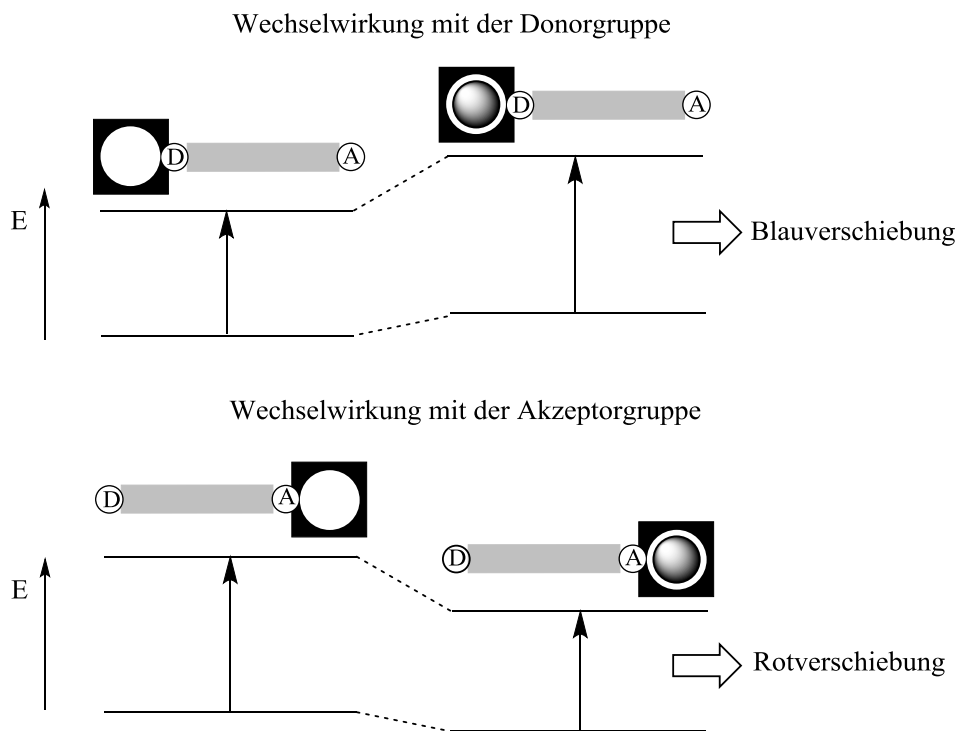


Abb. 15: Prinzip und Funktionsweise des PCT-Mechanismus (Abbildung modifiziert nach Valeur und Leray).⁷

2 Zielstellung

Ziel der Arbeit ist die Optimierung vorhandener und die Synthese neuer Natriumionenindikatoren für Natriummessungen in lebenden Zellen. Dabei ist es besonders wichtig, eine möglichst selektive Bindung von Natriumionen in Gegenwart hoher Kaliumionenkonzentrationen zu erzielen. Ausgehend von den in Abschnitt 1.4 beschriebenen Ionophoren sollen verschiedene Strategien verfolgt werden, neue Indikatoren zu synthetisieren:

1. Es soll erforscht werden, ob mit Hilfe der auf der Arbeit von Minta und Tsien basierenden **Diaza-[15]Krone-5 Ionophor** neue Natriumindikatoren entwickelt werden können.⁸ Dabei ist es von besonderem Interesse, eine vereinfachte Synthese für das Grundionophor zu etablieren, da es bisher nur in 5 – 6 Stufen synthetisiert werden kann (Abb. 16A).¹³
2. Ein weiterer Natriumionenindikator, der auf einer **Kryptandstruktur** basiert, soll entwickelt werden. Der Kryptand [2.1.1] scheint besonders geeignet, da er die höchste Natrium-Kalium-Selektivität und eine etwas geringere Komplexstabilitätskonstante als [2.2.1] aufweist (Abb. 13). Ein Sauerstoffatom muss durch ein Stickstoffatom substituiert werden, um an dieser Stelle das Fluorophor einbringen zu können (Abb. 16B).
3. Auf der Grundlage der Arbeiten von Suzuki et al. soll ein Natriumionenindikator entwickelt werden, der auf einem **[16]Krone-5-Ionophor** mit großen Seitengruppen basiert.²⁶ Wiederum muss ein Sauerstoff- durch ein Stickstoffatom substituiert werden, um an dieser Stelle das Fluorophor einbringen zu können. Die Komplexstabilitätskonstante kann an dieser Stelle durch Einführung einer Methoxy- oder ähnlicher Gruppen in *para*-Position erhöht werden (Abb. 16C).

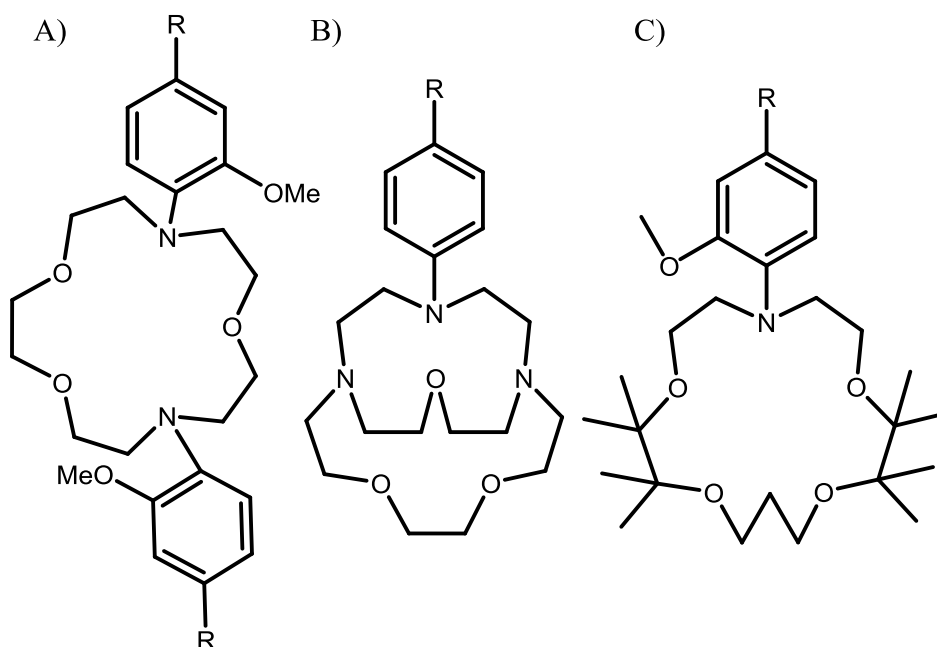


Abb. 16: Zielstrukturen der Arbeit mit R = Fluorophor.

A) Grundionophor nach Minta und Tsien, B) kryptandbasierendes Ionophor und C) [16]Krone-5 Ionophor nach Suzuki.

4. Die Indikatoren bestehen aus einem Ionophor und einem Fluorophor, daher müssen neben den neuen Ionophoren auch passende Fluorophore ausgewählt und synthetisiert werden. Für diese Aufgabe scheinen die bereits oben diskutierten Xanthenfarbstoffe und Styrylfarbstoffe besonders geeignet, da sie gute Eigenschaften aufweisen und bereits für Ionenindikatoren eingesetzt werden. Die neu synthetisierten Fluoroionophore sollen sowohl chemisch als auch spektroskopisch charakterisiert werden. Die spektroskopische Charakterisierung soll insbesondere hinsichtlich Absorption, Fluoreszenz und Quantenausbeute erfolgen. Aus der Änderung der Fluoreszenz mit der Ionenkonzentration kann die Berechnung der Dissoziationskonstante erfolgen.
5. Die Eigenschaften ausgewählter Natriumindikatoren sollen in lebenden Zellen untersucht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese von Diaza-[15]Krone-5-basierenden Natriumionen-indikatoren

3.1.1 Synthesestrategie

Das erste Ziel war es, für das Diaza-[15]Krone-5-Ionophor eine neue, einfache Syntheseroute zu finden. Die Synthese des Ionophors über eine nukleophile Substitution in einem Schritt schien besonders geeignet. Am Diaza-[15]Krone-5-Ionophor können dann verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe aufgebaut werden.

3.1.2 Synthese des Diaza-[15]Krone-5-Ionophors 7

Um Fluoraromaten mit sekundären Aminen umzusetzen, müssen meist drastische Reaktionsbedingungen gewählt werden. Die Reaktionstemperatur liegt deutlich über 100°C oder es kommt Ultraschall zum Einsatz. Tsien und Minta setzten in einer nukleophilen Aromatensubstitution einen elektronenarmen Fluoraromaten mit Diaza-[15]Krone-5 **5** um.⁸ Entsprechend ihrer Vorschrift wurde **5** und 4-Fluor-3-methoxybenzaldehyd in siedendem Pyridin umgesetzt, jedoch konnten nur die Ausgangsstoffe detektiert werden, die Reaktionsbedingungen schienen noch zu „mild“ zu sein. Magdolen et al. konnten für einige nukleophile Aromatensubstitutionen die Ausbeuten mit Ultraschall, im Vergleich zur normalen Erwärmung, deutlich gesteigert werden.³⁷ In DMSO wurden **5** und 4-Fluor-3-methoxybenzaldehyd mit K₂CO₃ erst bei schwacher, dann bei zunehmend starker Leistung mit Ultraschall behandelt. Erst trat keine Veränderung ein, dann fing das DMSO stark zu kochen an, so dass sich die Reaktionskontrolle schwierig gestaltete. Im MS konnten sowohl die Ausgangsstoffe als auch, in deutlich größerer Menge, das einfache Reaktionsprodukt von **5** und dem Aromat nachgewiesen werden. Die Reaktion lief unvollständig ab. Nach einigen weiteren Experimenten zeigte sich, dass thermische Erhitzung auf 130 °C für mehrere Tage die besten Resultate erzielte (Abb. 17).

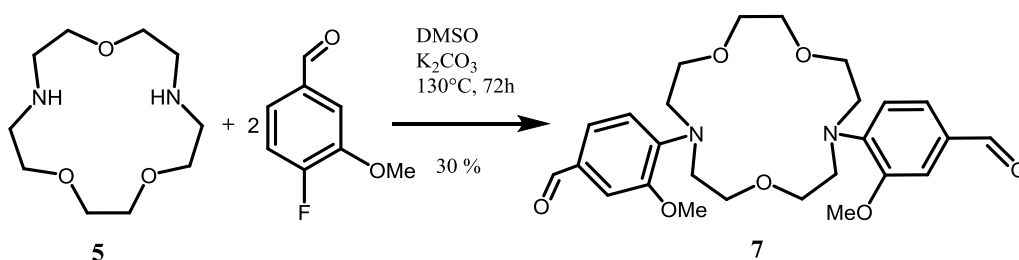


Abb. 17: Synthese der Ionophors **7** aus **5** und 4-Fluor-3-methoxybenzaldehyd.

Da einige Nebenprodukte entstanden, war die Reinigung aufwendig. Nach der Extraktion des Rohproduktes wurden zwei Gelfiltrationen durchgeführt, um einen Großteil der Nebenprodukte abzutrennen. Dann schlossen sich, je nach Reinheit, ein bis zwei Säulenchromatographien an. Insgesamt konnte **7** in Ausbeuten von etwa 30 % sehr rein gewonnen werden. Eine Probe des entstehenden amorphen, hellgelben Feststoffes kristallisierte nach längerer Zeit aus.

3.1.3 Kristallstrukturen des Diaza-[15]Krone-5 Ionophors und eines Diaza-[15]Krone-5-Ionophor-Natriumionen-Komplexes

Das natriumfreie Ionophor **7** kristallisierte in weißen Kristallen in der Raumgruppe C2/c. Das symmetrische Molekül ordnete sich im Kristall in einer Art Faltblattstruktur an, wobei alle Heteroatome des Aza-Kronenethers etwa in einer Ebene lagen (Abb. 18). In einer weiteren Probe wurde das Ionophor mit NaPF₆ versetzt und kristallisierte in der Pbc_a Raumgruppe aus. Es bildeten sich Dimere aus 2 Natriumionen und 2 Molekülen **7** (Abb. 19). Das Natriumion wurde von den 5 Heteroatomen des Aza-Kronenethers, die etwa in einer Ebene lagen, den 2 Methoxygruppen, die beide in der gleichen Richtung aus der Ebene ragten, und einer Aldehydgruppe des 2. Ionophors komplexiert. Die beiden Natriumionen wurden jeweils 8fach koordiniert. Der Bindungsabstand zwischen den Heteroatomen und Na⁺ lag zwischen 2,4292 Å (Na1-O3) und 2,8584 Å (Na1-N2). Diese Struktur unterschied sich deutlich von der Struktur, die für einen anders substituierten Kronenether gewonnen wurde. In dieser Kristallstruktur bestand das Ionophor wie **7** aus Diaza-[15]Krone-5 mit 2 *ortho*-Methoxyphenyl-Gruppen, aber es wies keine Aldehydgruppen auf. Das Natriumion war 7fach koordiniert, der Aza-Kronenether bildete eine Ebene, in deren Mitte das Natriumion lag, und ober- und unterhalb der Ebene wurde das Ion zusätzlich von den Methoxygruppen koordiniert.²³

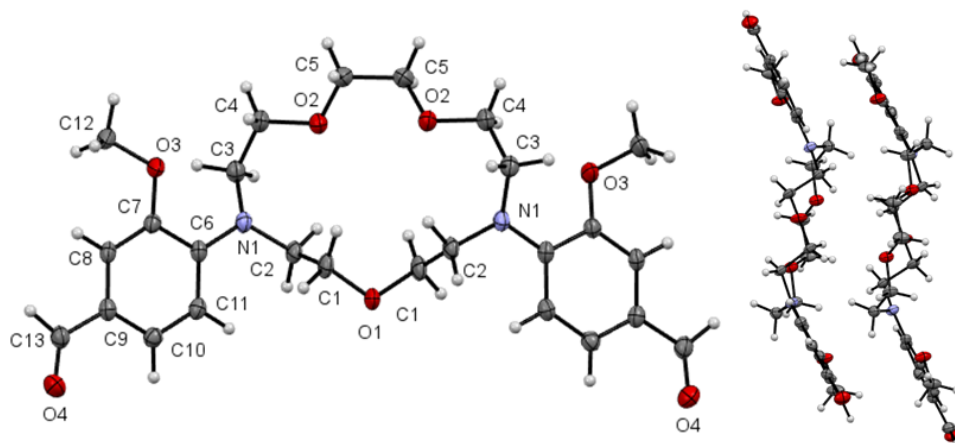


Abb. 18: Kristallstruktur der Verbindung 7; ausgewählte Bindungsabstände [Å] und Winkel [°]:
O1-C1 1,4258(15), N1-C2 1,4613(16), N1-C6 1,3905(16), N1-C3 1,4700(18), O4-C13 1,2104(18), O3-C7 1,3686(19), O3-C12 1,4255(16), C7-O3-C12 116,69(11), C6-N1-C3 120,77(11).

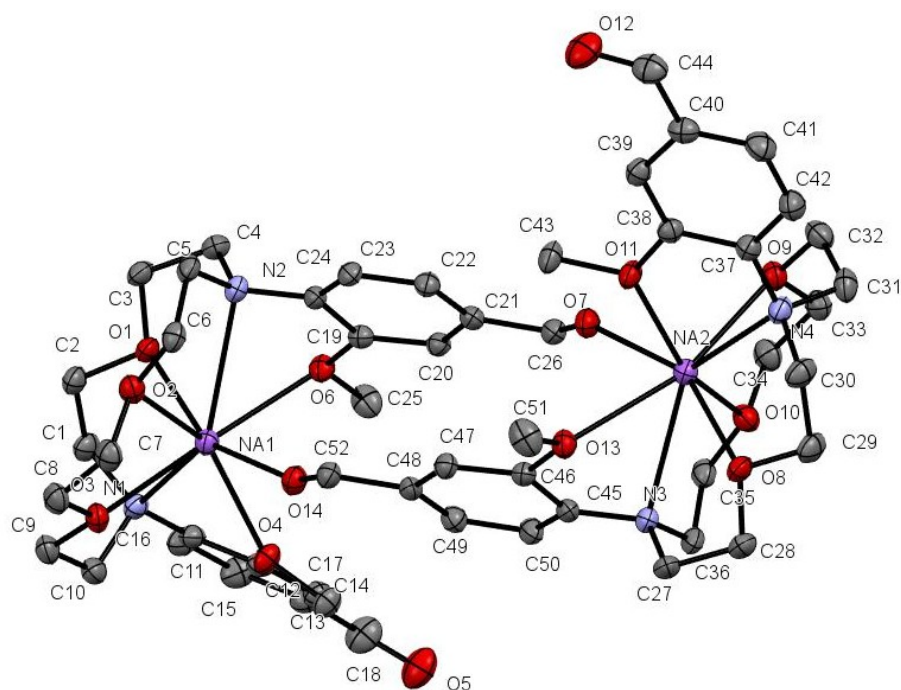


Abb. 19: Kristallstruktur von 7a mit NaPF₆; ausgewählte Bindungsabstände [Å] und Winkel [°]:
Na1-O3 2,4292(15), Na1-O1 2,4459(15), Na1-O14 2,4601(15), Na1-O6 2,5861(15), Na1-O2 2,5873(16), Na1-O4 2,5939(15), Na1-N1 2,7752(17), Na1-N2 2,8584(17), C24-N2-C4 116,26(15).

3.1.4 Aufbau von fluoresceinähnlichen Xanthenderivaten aus Ionophor 7

Die Synthese von Xanthenderivaten verläuft, wenn sie aus Aldehyden und Phenolderivaten aufgebaut werden, über drei Reaktionsschritte. Im ersten Schritt entsteht durch elektrophile Substitution, ein Triphenylmethanfarbstoff (TPMF). Dieser wird cyclisiert zum entsprechenden Leuko-Farbstoff (Leuko). Zuletzt bildet sich das Xanthenderivat durch Oxidation (Abb. 20).

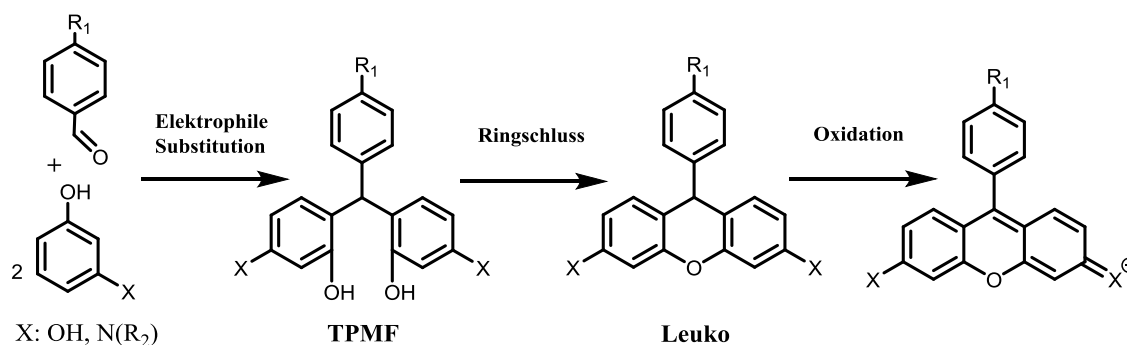


Abb. 20: Allgemeine Synthese der Xanthene aus Aldehyden und Phenolderivaten.

Als Zwischenprodukt treten der Triphenylmethanfarbstoff (TPMF) und der Leuko-Farbstoff (Leuko) auf. Ist der Substituent X ein Stickstoffatom, handelt es sich um ein Rhodamin, ist X ein Sauerstoffatom, handelt es sich um ein fluoresceinähnliches Xanthenderivat.

Setzt man Aldehyde mit Resorcinol oder seinen Halogenderivaten um, kommt man zu fluoresceinähnlichen Xanthenverbindungen. Gee und Martin setzten Ionophore mit Aldehydgruppen mit Resorcinolderivaten in $MeSO_3H$ bei RT um und sie erhielten den entsprechenden Leuko-Farbstoff (Leuko).¹¹ Diesen konnten sie mit Chloranil in hohen Ausbeuten oxidieren. Zuerst wurde **7** mit Resorcinol nach der Vorschrift von Gee und Martin in $MeSO_3H$ umgesetzt. Die sich anschließende Oxidation, zuerst mit Chloranil und dann DDQ, brachte kein fluoreszierendes Produkt hervor. Die Synthese nach Gee und Martin schien damit zur Synthese von Fluoreszenzfarbstoffen aus **7** nicht geeignet.

Bacci und Van Vranken entwickelten eine Methode, um unter milden Bedingungen und in hohen Ausbeuten Xanthenderivate herzustellen.³⁸ Sie setzten Aldehyde mit 4-Fluorresorcinol in verdünnter $MeSO_3H$ um und erhielten den entsprechenden TPMF, den sie in guten Ausbeuten mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) oxidativ cyclisieren konnten. Nach der Vorschrift von Bacci und Van Vranken wurde **7** mit 4-Fluorresorcinol in verdünnter $MeSO_3H$ umgesetzt und wie beschrieben entstand der TPMF. Dieser wurde mit DDQ umgesetzt. Die Dünnschichtchromatographie und

das Massenspektrum (MS) zeigten, dass keine oxidative Cyclisierung erfolgte. Der TPMF schien zu unreaktiv zu sein. Er wurde mit Eisessig, Polyphosphorsäure, H_2SO_4 und Eisessig/Chloranil bei 110 – 130 °C umgesetzt, um ihn zu cyclisieren. Bei der Behandlung mit Eisessig konnten kleine Mengen von teilweise oxidiertem Produkt nachgewiesen werden. Bei Behandlung mit 66 %iger H_2SO_4 zeigten sich im MS Spuren vom Produkt **9**. Zuletzt wurde der TPMF in MeSO_3H bei 74 °C umgesetzt und es ergab sich eine starke grüne Fluoreszenz (Abb. 21). Nach der Aufarbeitung blieb wenig Substanz zurück, und es konnte keinem Signal im MS Produkt **9** zugeordnet werden.

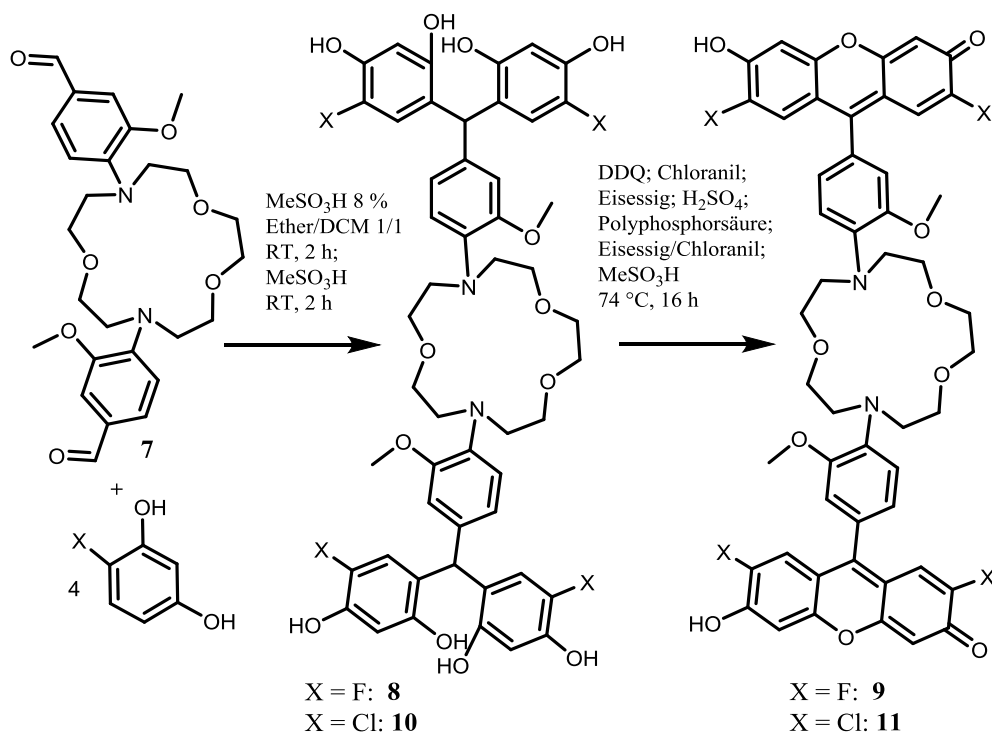


Abb. 21: Reaktion von 7 mit 4-Fluorresorcinol und 4 Chlorresorcinol zum entsprechenden TPMF und Oxidation zu 9 und 11.

Da 4-Fluorresorcinol sehr teuer ist und der entstandene TPMF sehr unreaktiv schien, wurde **7** nach der gleichen Prozedur mit 4-Chlorresorcinol in verdünnter MeSO_3H bei RT umgesetzt. Es entstand der entsprechende TPMF **10**, der sich nicht mit DDQ zu **11** umsetzen ließ. Bei Umsatz der Ausgangsstoffe in MeSO_3H bei RT zeigte sich eine schwache Fluoreszenz, aber es konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Bei erhöhter Temperatur in MeSO_3H entstand in einem Schritt Produkt **11**, aber es konnte nur eine kleine Menge isoliert werden und die Reinigung blieb unvollständig.

Ergebnisse und Diskussion

Zuletzt wurde **7** mit Resorcinol umgesetzt und die bisher gewonnenen Erkenntnisse angewandt. Um Xanthenderivate zu gewinnen, müssen die Ausgangsstoffe in reiner MeSO_3H bei Temperaturen von 70 – 80 °C umgesetzt werden. Bei der Reaktion der beiden Ausgangsstoffe in MeSO_3H bei 74 °C konnte ein fluoreszierendes Produkt gewonnen werden, welches durch präparative DC von den Nebenprodukten abgetrennt werden konnte. Im MS zeigte sich, dass zwei Produkte mit gleicher Fluoreszenz isoliert wurden. Es entstand das erwartete Produkt **12** und ein Produkt mit einer Masse, die zwischen dem Produkt **12** und dem vermuteten Produkt aus der Reaktion von **7** mit zwei Molekülen Resorcinol lag. Wahrscheinlich entstand Derivat **13** als Nebenprodukt aus einer unvollständigen Reaktion von **7** mit Resorcinol. Bei weiteren Ansätzen entstanden wieder **12** und **13** neben weiteren Nebenprodukten, deren Masse keiner Struktur zugeordnet werden konnte.

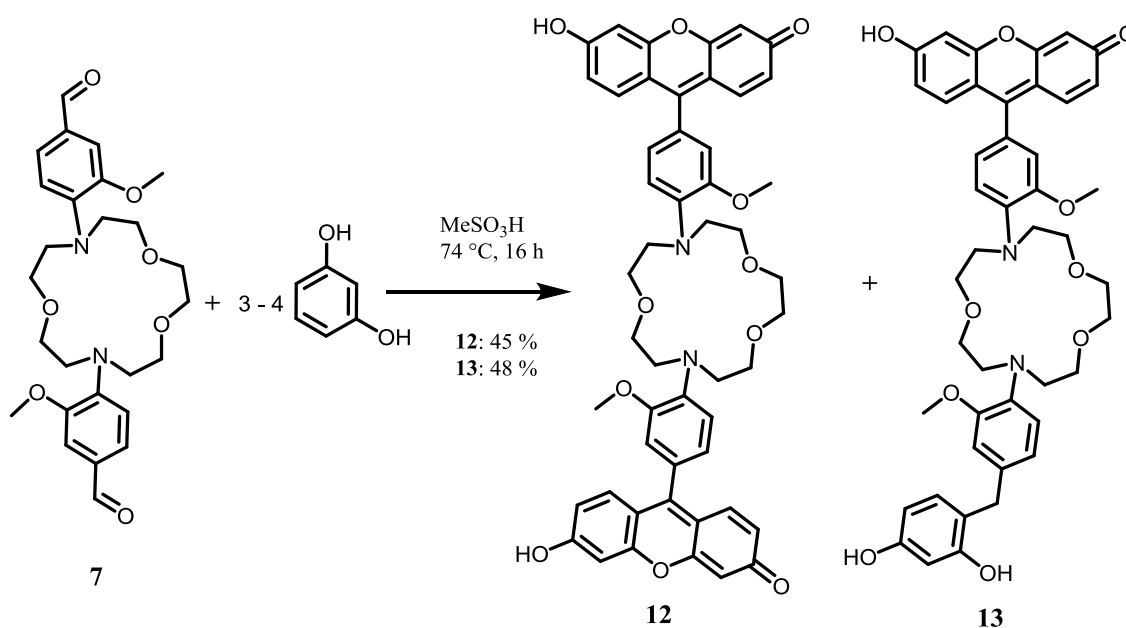


Abb. 22: Synthese von **12** und **13** aus **7** und Resorcinol.

Die ersten Versuche, beide Verbindungen chromatographisch über Aluminiumoxid, Kieselgel 60 und RP18-Silica zu trennen, schlugen fehl. Mit einem Gemisch aus MeOH und MeCN (1:1) mit CsCl ließen sich beide Substanzen auf Kieselgel trennen. Die Reinigung war aufwendig, da **12** zwar über Säulenchromatographie, aber **13** nur über präparative DC gereinigt werden konnte. Von beiden Verbindungen konnte durch NMR, MS und HR-MS Messungen die Struktur bestätigt werden. Verbindung **12** und

Verbindung **13** zeigten eine Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz, die bei Verbindung **13** deutlicher ausgeprägt war (siehe Kapitel 3.2.1). Ein Problem, das bei beiden Indikatoren auftrat, war jedoch die relativ große pH-Abhängigkeit und eine zeitliche Abhängigkeit der Fluoreszenz. Bei Natriumionenzugabe stieg die Fluoreszenz über einen längeren Zeitraum an, sank etwas und blieb dann konstant (siehe Kapitel 3.2.1.4). Als Ursache der Zeit- und pH-Abhängigkeit wurden die phenolischen Hydroxygruppen des Xanthenfarbstoffes identifiziert.

Um dieses Problem zu beheben, wurden die Hydroxygruppen verethert, indem die beiden Xanthenderivate **12** und **13** mit Diazomethan methyliert wurden. Mit diesem konnte **12** zu Derivat **14** umgesetzt werden. Da im Fall von Verbindung **13** die Methylierung unvollständig blieb, wurde sie in nachfolgenden Versuchen mit Methyljodid durchgeführt. Bei beiden Reaktionen entstand laut MS ein Gemisch aus Verbindungen verschiedener Methylierungsgrade. Die Gemische wurden mittels präparativer DC gereinigt. Obwohl eine klare Auftrennung erkennbar war, blieb die Reinigung unvollständig.

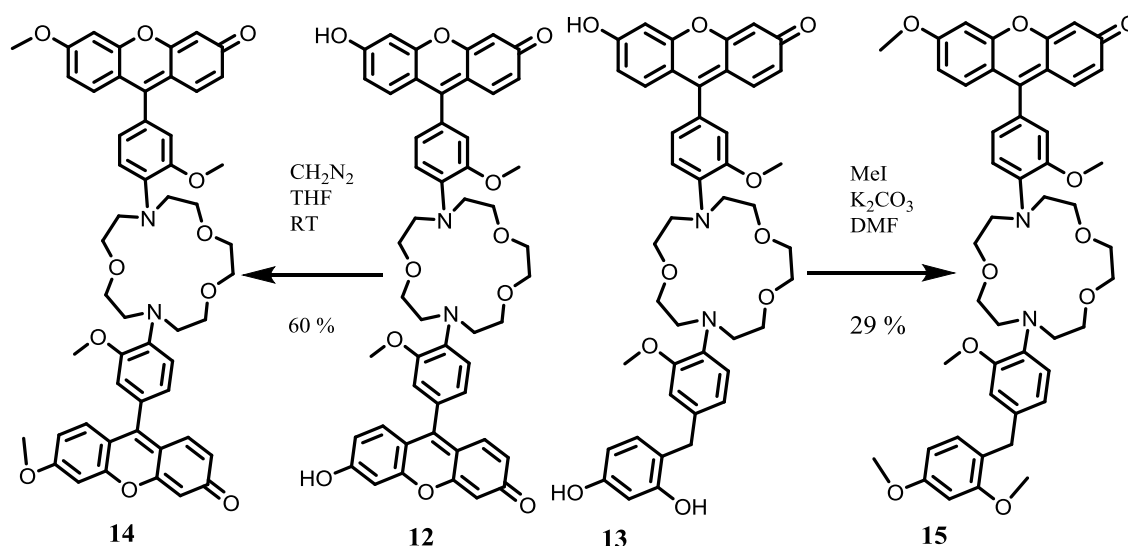


Abb. 23: Methylierung der Indikatoren 12 und 13 mit Diazomethan und MeI.

Die Ursache der mangelhaften Methylierung lag wahrscheinlich in der Struktur beider Indikatoren begründet. Neben den Hydroxygruppen wiesen sie weitere Heteroatome auf, die ebenfalls methyliert werden können. Im Einklang hierzu wurden in den MS-Spektren auch höhere Massen beobachtet.

Da die Veretherung von Amino- und Hydroxygruppen mit Bromessigsäureestern oft in guten Ausbeuten funktioniert, wurde **13** mit *tert*-Butylbromacetat umgesetzt.³⁹ Um einen möglichst vollständigen Umsatz zu erreichen, musste mit einem Überschuss an *tert*-Butylbromacetat und einer längeren Reaktionszeit gearbeitet werden. Nach der Aufreinigung über präparative DC wurde **16** sauber erhalten. Die Struktur konnte über ¹H-NMR, MS und HR-MS bestätigt werden. Anschließend wurde der *tert*-Butylester mit Trifluoressigsäure (TFA) vollständig gespalten (Abb. 24).

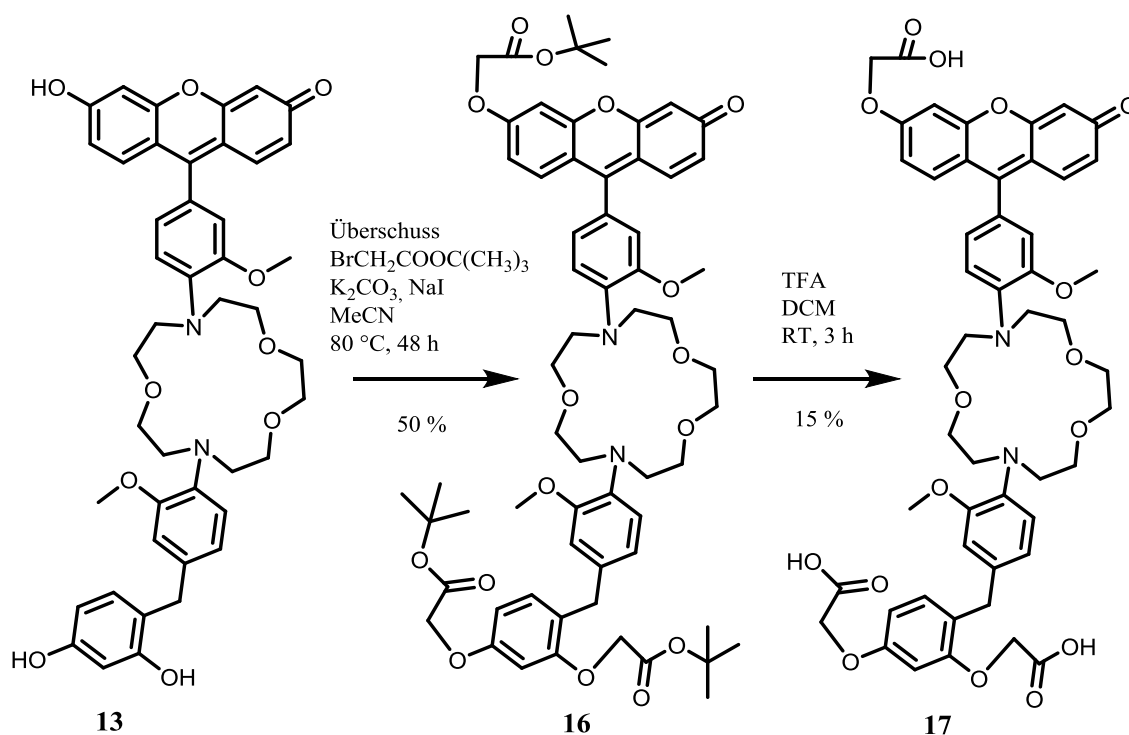


Abb. 24: Reaktion des Xanthenderivates **13** mit *tert*-Butylbromacetat zu **16** mit anschließender Esterspaltung zu Derivat **17**.

Nach der Aufarbeitung konnte nur ein Produkt identifiziert werden, bei dem es sich wahrscheinlich um ein einfaches Methylesterderivat von **17** handelte. Eine versuchte Esterspaltung blieb erfolglos. In einem weiteren Ansatz hergestelltes **16** wurde, nach der chromatographischen Reinigung, direkt mit TFA umgesetzt und getrocknet. Der Indikator **17** konnte identifiziert und über eine präparative RP-18-DC gereinigt werden. Es blieb ein polares, gut wasserlösliches Produkt zurück.

Die Struktur von **17** konnte durch ^1H -NMR, MS, HR-MS, DC, UV-Vis- und Fluoreszenzspektren bestätigt werden. Verbindung **17** zeigte eine sehr starke Natriumionenabhängigkeit der Fluoreszenz, während die Zeitabhängigkeit nicht vorhanden und die pH-Abhängigkeit gering war (siehe Kapitel 3.2.6.2).

Auch **12** wurde mit *tert*-Butylbromacetat umgesetzt, es musste eine geringere Reaktionszeit und ein geringerer Überschuss an *tert*-Butylbromacetat als beim Derivat **13** eingesetzt werden, da sonst zu viele Nebenprodukte entstanden. Das erhaltene Produkt **18** wurde über präparative DC gereinigt und mit TFA zu **19** umgesetzt (Abb. 25). Die Reinigung des Rohproduktes von **19** erfolgte über präparative RP-18-DC, die erhaltene Produktfraktion schien auf Grund der DC sauber. Die Aufreinigung blieb unvollständig. Das MS zeigte einige Nebenprodukte und es ließen sich keine NMR- und HR-MS-Spektren gewinnen. Das erhaltene polare und wasserlösliche Produkt **19** zeigte ähnliche Eigenschaften wie **17**. Nur war die Natriumionenabhängigkeit der Fluoreszenz geringer (siehe Kapitel 3.2.5.3).

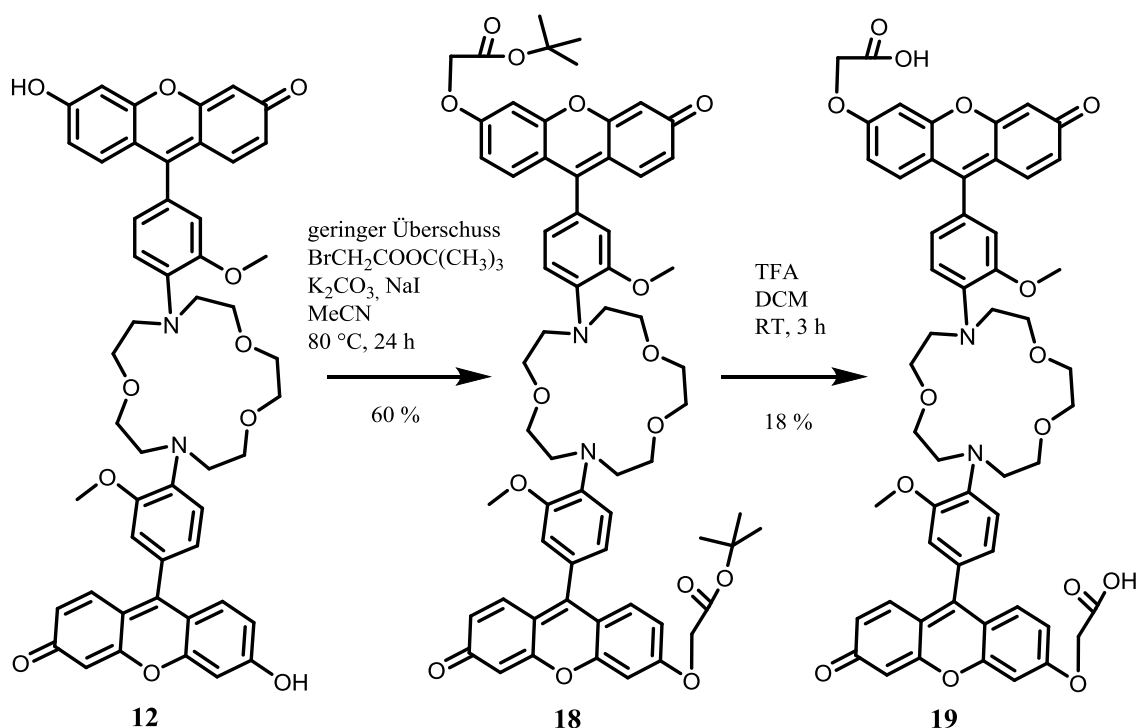


Abb. 25: Reaktion des Xanthenderivates **12** mit *tert*-Butylbromacetat zu **18** mit anschließender Esterspaltung zu Derivat **19**.

3.1.5 Synthese von Styrylfarbstoffderivaten aus Ionophor 7

Ionophor **7** wurde mit CH-aziden Verbindungen zu Styrylfarbstoffderivaten umgesetzt. Bei der Reaktion von **7** mit einem Überschuss 1,4-Dimethylpyridiniumiodid konnte nicht das erwartete Produkt **20** erhalten werden. Aber die Reaktion von **7** mit einer äquimolaren Menge an 1,4-Dimethylpyridiniumiodid brachte Produkt **21** hervor (Abb. 26). Die Reinigung über präparative DC gelang, jedoch konnte nur eine geringe Menge an sauberem Produkt isoliert werden. Das Produkt **21** schien instabil zu sein, denn obwohl DC und MS im Rohprodukt eine große Menge an **21** zeigten, blieb nach der Reinigung nur eine sehr geringe Menge an **21** übrig. Eine weitere Menge an rohem **21** wurde über Aluminiumoxid chromatographiert, wobei trotz wiederholter Versuche zwar zwei ähnlich laufende rot-fluoreszierende Phasen isoliert, aber nicht vollständig getrennt werden konnten. Beide Phasen zeigen aber exakt die gleiche Masse ($M^+ = 776,2$), was dem Produkt **21** entsprach. Eventuell handelte es sich um die *cis*- und *trans*-Isomere. Ein Versuch, beide Isomere über präparative DC zu reinigen, schlug fehl, da das Produkt zerfiel. Es gelang somit nicht, Verbindung **21** rein zu erhalten. Untersuchungen des Isomerengemisches und einer relativ sauberen Fraktion zeigten, dass die emittierte Fluoreszenz von der Natriumionenkonzentration unabhängig war.

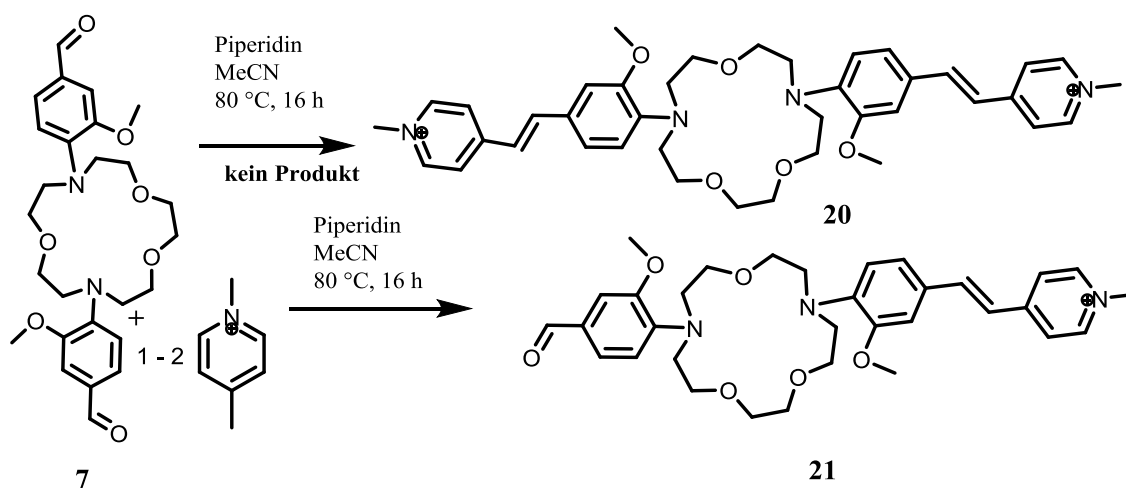


Abb. 26: Synthese des Styrylderivates **21** aus **7** und 1,4-Dimethylpyridiniumiodid.

Die Reaktion von **7** mit 2-(2,6-dimethyl-4H-pyran-4-yliden)-malononitril führte zu **23**, wobei das ebenfalls mögliche Produkt **22** nur in Spuren entstand (Abb. 27). Im Gegensatz zu **21** konnte **23** sehr leicht über präparative DC gereinigt werden. Überraschenderweise zeigte **23** keine Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz.

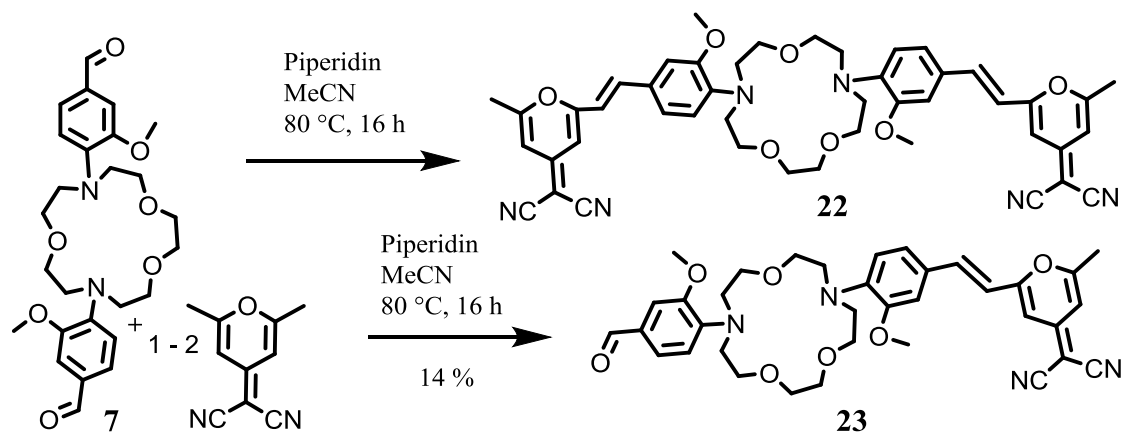


Abb. 27: Synthese der Styrylderivate 23 und 22 aus 7 und 2-(2,6-dimethyl-4H-pyran-4-yliden)-malononitril.

3.1.6 Aufbau von Rhodaminderivaten aus Ionophor 7

Nachdem die Synthese von Xanthen- und Styrylderivaten gelang, wurde die Synthese eines Ionophor-7-Rhodaminderivates angestrebt. Bei der Synthese von Rhodaminderivaten bestand das Hauptproblem darin, dass es nur wenige Publikationen^{11, 40, 41} und einige Patente^{10, 42} gibt, die sich mit ihrer Synthese beschäftigen. Allgemein wird ein Rhodamin wie andere Xanthenfarbstoffe, in drei Schritten aus einem Aldehyd aufgebaut (Abb. 20). Es gibt zwei Wege, um Rhodamine aus Aldehyden aufzubauen. In einer älteren Synthesevorschrift wurden die ersten beiden Syntheseschritte in 66 %iger H₂SO₄ und die Oxidation in verdünnter H₂SO₄ mit FeCl₃ durchgeführt.⁴² In einer neueren Vorschrift erfolgten die beiden ersten Syntheseschritte in Propionsäure, mit einer katalytischen Menge Toluolsulfonsäure oder Methylsulfonsäure und die Oxidation in Chloroform/Methanol mit Chloranil.¹⁰

Ionophor 7 wurde mehrfach, bei verschiedenen Reaktionsbedingungen, mit 24 umgesetzt (Abb. 28). In Propionsäure trat keine Reaktion auf. Erst in Gegenwart von TsOH oder MeSO₃H zeigte sich eine Reaktion. Die anschließende Oxidation des vermuteten Leuko-Farbstoffes mit Chloranil oder DDQ brachte kein fluoreszierendes Produkt hervor. Das MS zeigte, dass der Triphenylmethanfarbstoff nur in Spuren erhalten wurde und dass sich dieser nicht oxidieren ließ. Da bei verdünnten Säuren kein Umsatz und bei etwas stärkeren Säuren kaum Triphenylmethanfarbstoff und viele Nebenprodukte erhalten wurden, schien 24 ungeeignet, um es mit 7 zu Rhodaminverbindungen umzusetzen. Darum wurde 7 anschließend mit

Ergebnisse und Diskussion

3-Diethylaminophenol umgesetzt und der entsprechende Triphenylmethanfarbstoff entstand. Um zum Leuko-Farbstoff zu cyclisieren, wurde die Temperatur deutlich erhöht. Nach der anschließenden Oxidation mit Chloranil waren zwar in der Chromatographie rosarote fluoreszierende Phasen zu sehen, aber trotz zweier präparativer DCs konnte kein Produkt isoliert werden.

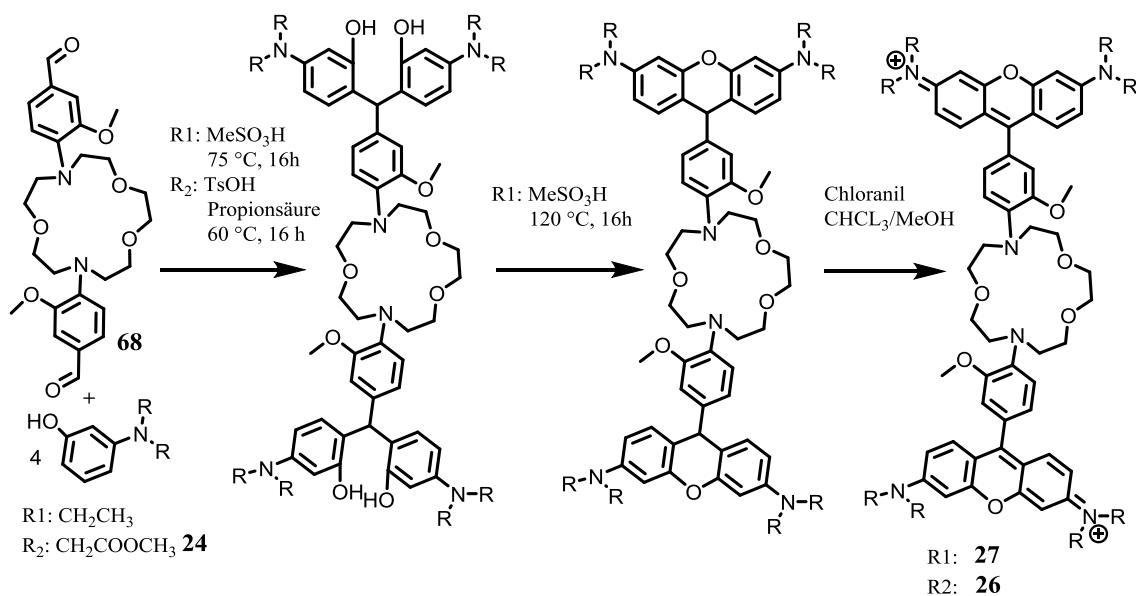


Abb. 28: Reaktion von 7 mit 24 und 3-Diethylaminophenol.

3.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Synthese des Ionophors **7** gelang relativ leicht. Die Ausbeute der nukleophilen Aromatensubstitution war zwar moderat, allerdings erfolgte die Reaktion zum Ionophor **7** in nur einem Reaktionsschritt. Als Resultat einer aufwendigen Aufreinigung wurde Ionophor **7** rein erhalten. Es gelang, das Ionophor mit und ohne Na⁺ zu kristallisieren und entsprechende Kristallstrukturen zu bestimmen. Zwar konnte kein Rhodaminderivat gewonnen werden, aber es gelang die Synthese der zwei Xanthenderivate **12** und **13**. Beide Strukturen wiesen eine Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Natriumionenkonzentration auf, wobei diese Eigenschaft bei **13** deutlich stärker ausgeprägt war als bei **12**. Ein großer Nachteil von **12** und **13** war die große pH- und Zeitabhängigkeit der Fluoreszenz (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.1). Durch Veretherung der phenolischen Hydroxygruppen mit *tert*-Butylbromacetat konnten **17** und **19** gewonnen werden. Diese beiden Indikatoren zeigten keine Zeit- und nur eine geringe pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz. Derivat **17** zeigte eine sehr hohe und **19** eine mittlere Natriumionenabhängigkeit der Fluoreszenz (siehe Kapitel 3.2.5 und 3.2.6). Die Synthese der Methylderivate **14** und **15** gestaltete sich schwierig. Auf Grund der vielen Nebenprodukte bei der Methylierung blieb die Reinigung unvollständig. Die Synthese von Styrylderivaten von **7** gelang relativ einfach. Derivat **21** konnte nur unvollständig gereinigt werden, während beim Derivat **23** die Reinigung sehr leicht gelang. Beide Styrylderivate zeigten keine Natriumionenabhängigkeit der Fluoreszenz (siehe Kapitel 3.2.8 und 3.2.7).

3.2 Spektroskopische Untersuchung der Diaza-[15]Krone-5-Ionophor-Farbstoffstrukturen

Von den in Abb. 29 dargestellten Indikatorstrukturen, deren Synthese in Abschnitt 3.1 beschrieben ist, wurden UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzspektren gemessen und daraus das Absorptions-, Anregungs- und Emissionsmaximum ermittelt.

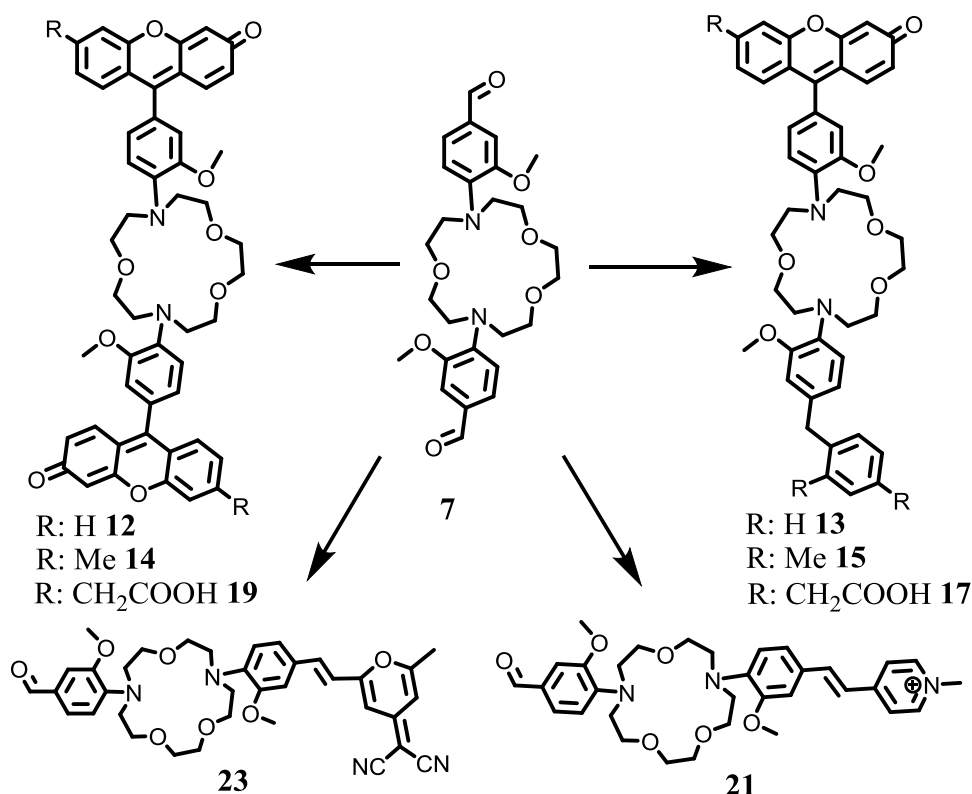


Abb. 29: Untersuchte Ionophor-7-basierende Farbstoffstrukturen.

Die relativen Quantenausbeuten der Verbindungen 13, 12, 19, 17 und 23 wurden, gegen eine Fluoresceinlösung in 0,1 M NaOH mit einer absoluten Quantenausbeute von $0,91 \pm 0,05$, berechnet (siehe Kapitel 5.5.2).^{43, 44} Indem ein Überschuss NaCl zu den Verbindungen gegeben und vor und nach der Zugabe die Fluoreszenz gemessen wurde, wurde geprüft, ob sich die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Natriumionenkonzentration ändert. Eine solche Abhängigkeit der Fluoreszenz wiesen die Verbindungen 13, 12, 19 und 17 auf. Vor der Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde, für die 4 Verbindungen der Einfluss der Kaliumionenkonzentration und des pH-Wertes auf die Fluoreszenz untersucht. Hierzu wurde zuerst die Fluoreszenz der Indikatoren in Gegenwart von 0 mM und 100 mM KCl in Abwesenheit von NaCl vermessen. Als

zweites wurden die Verbindungen jeweils in Gegenwart von 0 mM und 100 mM NaCl bei pH 6,8; 7,4 und 7,6 vermessen. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden von den Indikatorlösungen, die 0 – 150 mM NaCl enthielten, die Fluoreszenzintensitäten gemessen. Um eine konstante Ionenstärke zu gewährleisten, wurde NaCl durch Tetramethylammoniumchlorid oder KCl so komplementiert, dass die Gesamtkonzentration der Salze bei 150 mM lag. Das Fluoreszenzspektrum bei 0 mM NaCl wurde auf 1 normiert und die Spektren der höheren Natriumionenkonzentrationen auf dieses normierte Spektrum skaliert (siehe Kapitel 5.5.3). Die dadurch erhaltene relative Fluoreszenzintensität F/F_{\min} wurde in Abhängigkeit von der Natriumionenkonzentration aufgetragen und die Anpassung der Parameter von Gleichung (7) an die Daten lieferte den entsprechenden K_d Wert.^{6, 45, 46} Die maximale Änderung der Fluoreszenzintensität ergab sich aus Parameter p durch $F_{\max} = p + 1$.

$$\frac{F}{F_{\min}} = \frac{p[\text{Na}]}{K_d + [\text{Na}]} + 1, \quad \text{wobei} \quad \frac{F_{\max}}{F_{\min}} = 1 + p \quad (7)$$

3.2.1 Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur **13**

3.2.1.1 Messung der UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs-, Fluoreszenzemissionsspektren und der Quantenausbeute von **13**

Von **13** wurde ein Absorptionsmaximum von 494 nm und Emissionsmaximum von 514 nm ermittelt. Aus dem UV-Vis-Spektrum ergab sich ein Extinktionskoeffizient von $15940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Für Derivat **13** wurde eine relative Quantenausbeute von 0,002 (0,2 %) in Abwesenheit von Na^+ und 0,012 (1,2 %) in Gegenwart von 150 mM Na^+ berechnet.

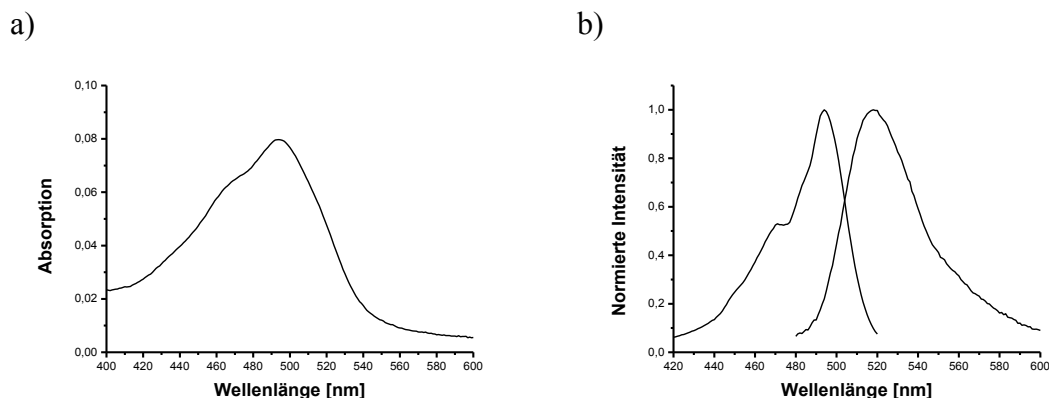


Abb. 30: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von 13.

Die Spektren von **13** ($5\ \mu\text{M}$) wurden in einer $10\ \text{mM}$ Hepes Lösung bei $\text{pH} = 7,4$ gemessen. a) Das UV-Vis-Spektrum wies ein Maximum bei $494\ \text{nm}$ auf und der Extinktionskoeffizient betrug $15940\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. b) Das normierte Fluoreszenzanregungsspektrum (linke Kurve) wies ein Maximum bei $494\ \text{nm}$ auf, die Emission wurde bei $520\ \text{nm}$ gemessen. Zur Messung des Fluoreszenzemissionsspektrums (rechte Kurven) wurde bei $450\ \text{nm}$ angeregt. Das Spektrum wurde auf 1 normiert und zeigte ein Maximum bei $514\ \text{nm}$. Es ergab sich eine Stokes-Verschiebung von $\Delta\lambda = 20\ \text{nm}$.

3.2.1.2 Messung der Fluoreszenzänderung von **13** bei variabler Kaliumionenkonzentration und bei verschiedenen pH-Werten

Die Messung der Fluoreszenzänderung ohne Na^+ bei $0\ \text{mM}$ und $100\ \text{mM}\ \text{K}^+$ zeigte, dass nur eine relativ geringe Kaliumabhängigkeit der Fluoreszenz bestand (Abb. 31a). Derivat **13** wies eine sehr hohe Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom pH-Wert auf (Abb. 31b).

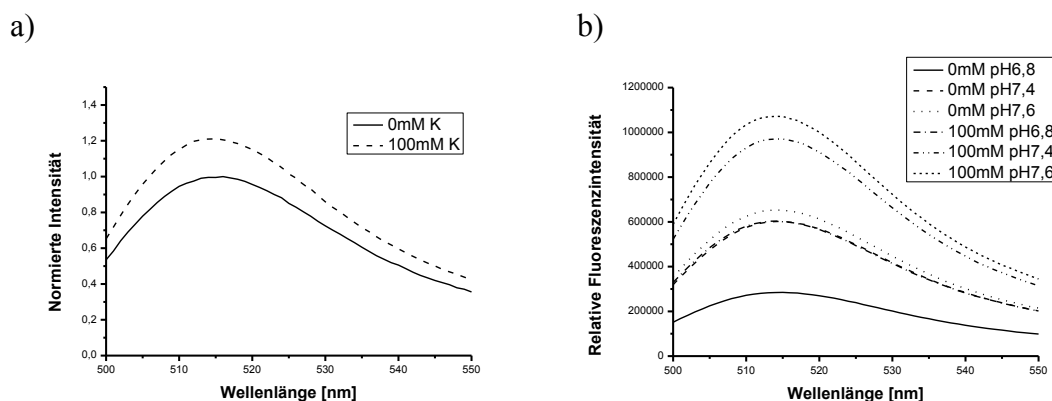


Abb. 31: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 13 von der Kaliumionenkonzentration und vom pH-Wert.

a) Fluoreszenzspektren von **13** ($5\ \mu\text{M}$) in Gegenwart von 0 (untere Kurve) und $100\ \text{mM}\ \text{K}^+$ (obere Kurve, gepunktete Linie). Beide Lösungen wurden mit $10\ \text{mM}$ Hepes gepuffert und auf $\text{pH} = 7,4$ eingestellt. Die maximale Fluoreszenz bei $0\ \text{mM}$ Kalium wurde auf 1 normiert und das zweite Fluoreszenzspektrum auf diesen Wert skaliert. b) Fluoreszenzspektren von **13** ($5\ \mu\text{M}$) in Gegenwart von 0 und $100\ \text{mM}\ \text{Na}$. Die Messungen wurden in Lösungen von $10\ \text{mM}$ Hepes Puffer durchgeführt die mit Tetramethylammoniumhydroxid auf $\text{pH}\ 6,8$, $7,4$ und $7,6$ eingestellt wurden.

3.2.1.3 Messung der Fluoreszenzänderung von **13** in Gegenwart von TMACl bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Derivat **13** zeigte in Gegenwart von TMACl eine sehr starke Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Natriumionenkonzentration, die Fluoreszenz stieg um das 8fache (150 mM Na). Es wurde die relative Fluoreszenz F/F_{\min} gegen die Konzentration aufgetragen und die Anpassung der Parameter von Gleichung (7) lieferte einen K_d -Wert von $K_d = 10$ mM mit $p = 7$ bzw. $F_{\max} = 8$.

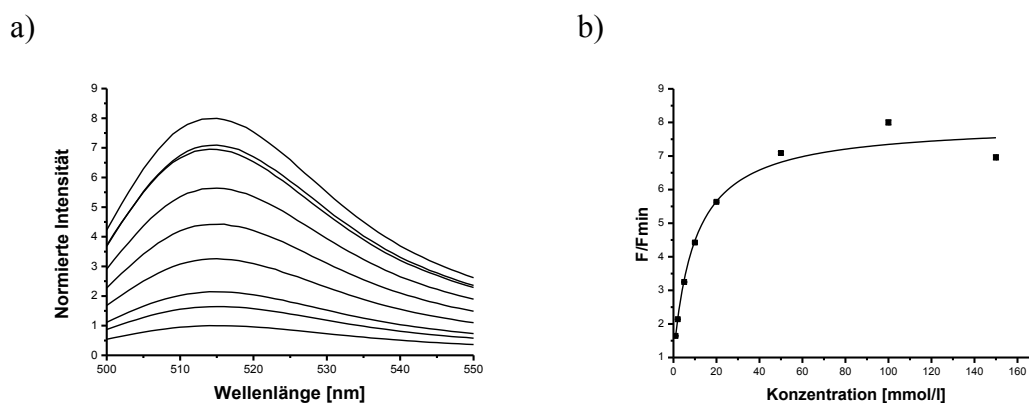


Abb. 32: Abhängigkeit der Fluoreszenz von **13 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von TMACl.**

a) Fluoreszenzspektren von **13** (5 μ M) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 150 mM Na. Um eine konstante Ionenstärke von 150 mM zu gewährleisten, wurde so viel TMACl zugesetzt, dass $[\text{Na}^+] + [\text{TMACl}^+] = 150$ mM galt. Alle Lösungen wurden mit 10 mM Hepes gepuffert und auf pH = 7,4 eingestellt. Die maximale Fluoreszenz bei 0 mM Na^+ wurde auf 1 normiert und alle anderen Fluoreszenzspektren auf diesen Wert skaliert. b) Die relative Fluoreszenz F/F_{\min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

Da die Fluoreszenz nach Zugabe des Indikators zur Messlösung einer starken zeitlichen Schwankung unterlag, wurden alle Werte 1 h nach Zugabe des Indikators gemessen. Eine solche zeitliche Schwankung trat auch beim Derivat **12** auf. Für **13** wurde die zeitliche Abhängigkeit der Fluoreszenz genauer untersucht.

3.2.1.4 Messung der zeitlichen Fluoreszenzänderung von **13** bei konstanter Natriumionenkonzentration

Um die zeitlichen Schwankungen der Fluoreszenzintensität näher zu untersuchen, wurde sie über einen Zeitraum von 80 min nach Zugabe von 50 mM Na^+ zu Derivat **13** gemessen (Abb. 33). Es zeigte sich zuerst ein starker Anstieg, dann ein leichter Abfall der Fluoreszenzintensität, bis diese sich nach etwa 30 – 40 min auf einen stabilen Wert einstellte. Das Fluoreszenzmaximum verschob sich nicht. Ein ähnliches Verhalten

konnte bei Derivat **12** und **13** bei allen Natriumionenkonzentrationen beobachtet werden. Durch Messungen der Fluoreszenz eine Stunde nach der Indikatorzugabe konnten bei beiden Derivaten die K_d -Werte bestimmt werden.

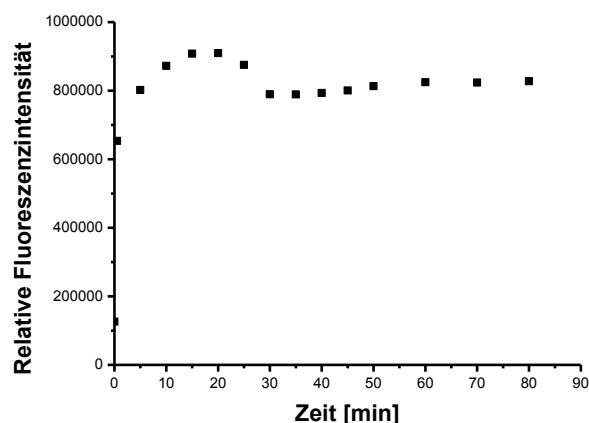


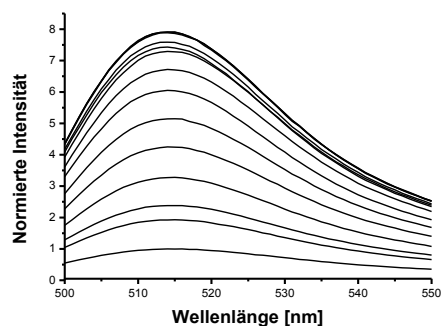
Abb. 33: Zeitliche Abhängigkeit der Fluoreszenz.

Maximum der Fluoreszenzspektren von **13** (5 μ M), zu verschiedenen Zeiten nach der Zugabe von 50 mM Na^+ gemessen. Die Lösung wurde mit 10 mM Hepes gepuffert und auf pH = 7,4 eingestellt.

3.2.1.5 Messung der Fluoreszenzänderung von **13** bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Da bei Verbindung **13** eine Sättigung des Fluoreszenzsignals erst bei höheren Konzentrationen zu beobachten war, wurde der K_d -Wert zunächst nur in gepufferten NaCl Lösungen, ohne Zusatz von TMAcI oder KCl, bestimmt. Die Parameter von Gleichung (7) ließen sich nur schlecht anpassen und lieferten ein K_d -Wert von 7,3 mM mit $p = 6,2$ und $F_{\text{max}} = 7,2$.

a)



b)

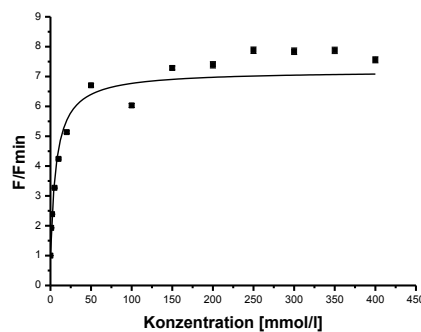


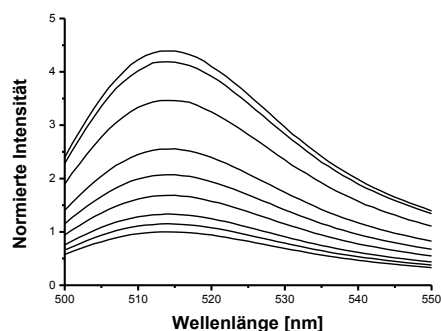
Abb. 34: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 13 von der Natriumionenkonzentration.

a) Fluoreszenzspektren von **13** (5 μM) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 und 400 mM Na. b) Die relative Fluoreszenz F/F_{\min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

3.2.1.6 Messung der Fluoreszenzänderung von **13** in Gegenwart von Kaliumionen bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Es wurde die Fluoreszenzänderung bei variablen Natriumionenkonzentrationen in Gegenwart von Kaliumionen gemessen. Die relative Fluoreszenz F/F_{\min} wurde gegen die Konzentration aufgetragen und die Anpassung der Parameter von Gleichung (7) ergaben einen K_d -Wert von 25,4 mM mit $p = 3,8$ bzw. $F_{\max} = 4,8$. Da das Kaliumion eine ähnliche Größe wie das Natriumion aufweist, konkurriert es mit Natrium um das Ionophor, dadurch war der berechnete K_d -Wert deutlich größer als der berechnete K_d -Wert in Gegenwart von TMACl.

a)



b)

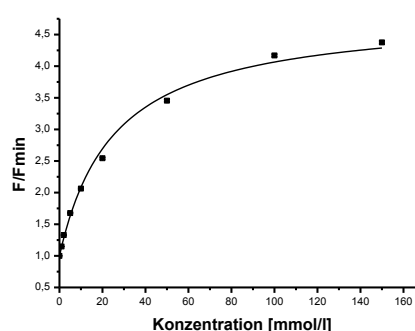


Abb. 35: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 13 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von K.

a) Fluoreszenzspektren von **13** (5 μM) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 150 mM Na^+ (obere Kurve). Um eine konstante Ionenstärke von 150 mM zu gewährleisten wurde so viel K^+ zugesetzt, dass $[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 150 \text{ mM}$ galt. b) Die relative Fluoreszenz F/F_{\min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

3.2.2 Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur **12**

3.2.2.1 Messung der UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs-, Fluoreszenzemissionsspektren und der Quantenausbeute von **12**

Von Derivat **12** wurden UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzspektren gemessen und die Absorptionsmaxima (494, 473 nm) und das Emissionsmaximum (514 nm) bestimmt. Aus dem UV-Vis-Spektrum ergab sich $\epsilon = 25281 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 494 nm. Für Derivat **12** wurde eine relative Quantenausbeute von 0,005 (0,5 %) in Abwesenheit von Na^+ und 0,003 (0,3 %) in Gegenwart von 150 mM Na^+ berechnet.

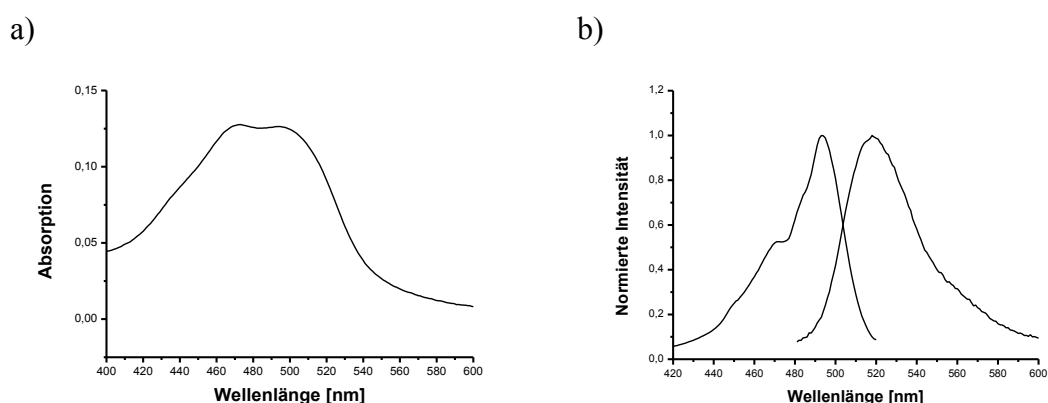


Abb. 36: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von **12.**

a) Das UV-Vis-Spektrum wies Maxima bei 494 und 473 nm auf und der Extinktionskoeffizient betrug $25281 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (494 nm). b) Das normierte Fluoreszenzanregungsspektrum (linke Kurve) wies ein Maximum bei 494 nm auf, die Emission wurde bei 520 nm gemessen. Zur Messung des Fluoreszenzemissionsspektrums (rechte Kurven) wurde bei 450 nm angeregt. Das Spektrum wurde auf 1 normiert und zeigte ein Maximum bei 514 nm. Es ergab sich eine Stokes-Verschiebung von $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$.

3.2.2.2 Messung der Fluoreszenzänderung von **12** bei variabler

Kaliumionenkonzentration und bei verschiedenen pH-Werten

Derivat **12** zeigte wie **13** eine sehr hohe Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom pH-Wert (Abb. 37b) und eine geringe Kaliumabhängigkeit der Fluoreszenz (Abb. 37a).

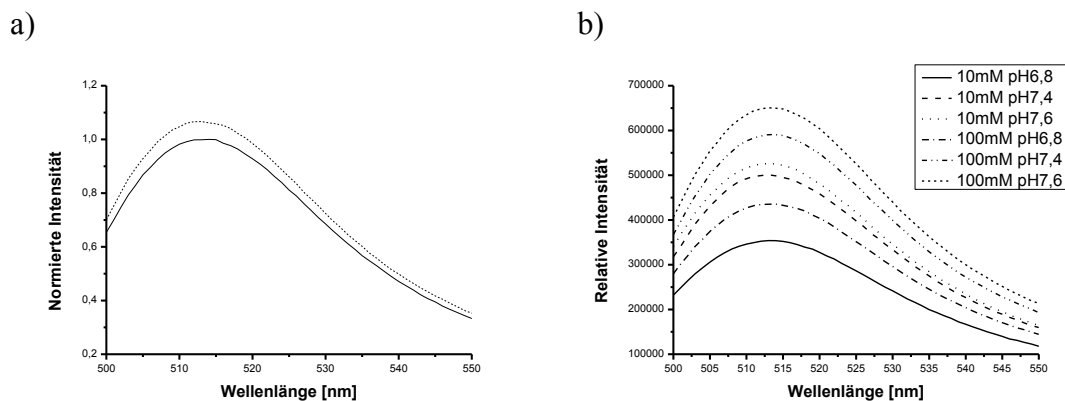


Abb. 37: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 12 von der Kaliumionenkonzentration und vom pH-Wert.

a) Fluoreszenzspektren von **12** (5 μM) in Gegenwart von 0 (untere Kurve) und 100 mM K^+ (obere Kurve, gepunktete Linie). b) Fluoreszenzspektren von **12** (5 μM) in Gegenwart von 0 und 100 mM Na^+ . Die Messungen wurden in Lösungen mit pH 6,8; 7,4 und 7,6 durchgeführt.

3.2.2.3 Messung der Fluoreszenzänderung von **12** in Gegenwart von TMACl bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Derivat **12** zeigte in Gegenwart von TMACl eine relativ geringe Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Natriumionenkonzentration, die Fluoreszenz stieg lediglich um das 2fache. Es wurde die relative Fluoreszenz F/F_{\min} gegen die Konzentration aufgetragen und die Anpassung der Parameter von Gleichung (7) lieferte einen K_d -Wert von 16,3 mM mit $p = 1,0$ bzw. $F_{\max} = 2,0$.

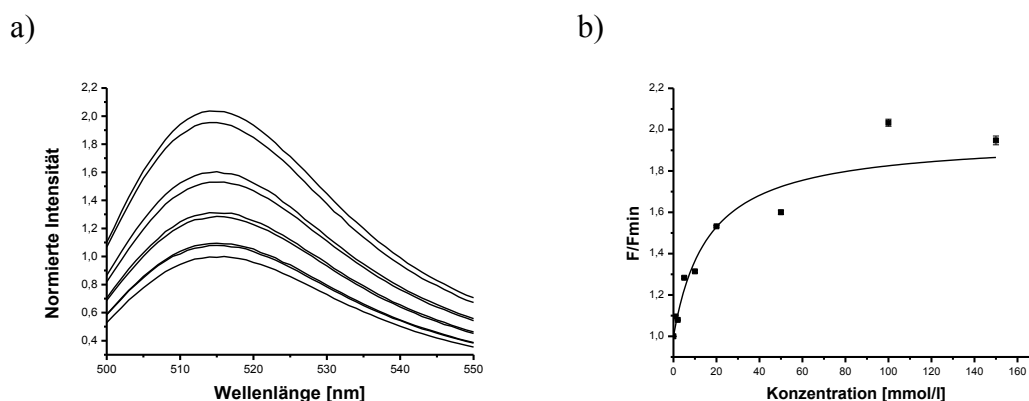


Abb. 38: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 12 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von TMACl.

a) Fluoreszenzspektren von **12** (5 μM) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 150 mM Na^+ . b) Die relative Fluoreszenz F/F_{\min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

Ergebnisse und Diskussion

Die gemessenen Fluoreszenzwerte für die jeweiligen Natriumionenkonzentrationen wurden alle 60 min nach Zugabe des Indikators gemessen, da wie es bereits für Derivat **13** gezeigt wurde (vgl. Kapitel 3.2.1.4) die Fluoreszenz einer starken zeitlichen Schwankung unterlag.

3.2.2.4 Messung der Fluoreszenzänderung von **12** bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Für Derivat **12** wurde die Fluoreszenzänderung zunächst bei variablen Natriumionenkonzentrationen ohne TMAcI gemessen. Es ergaben sich unter diesen Bedingungen ein K_d -Wert von 26,4 mM mit $p = 1,4$ bzw. $F_{\max} = 2,4$.

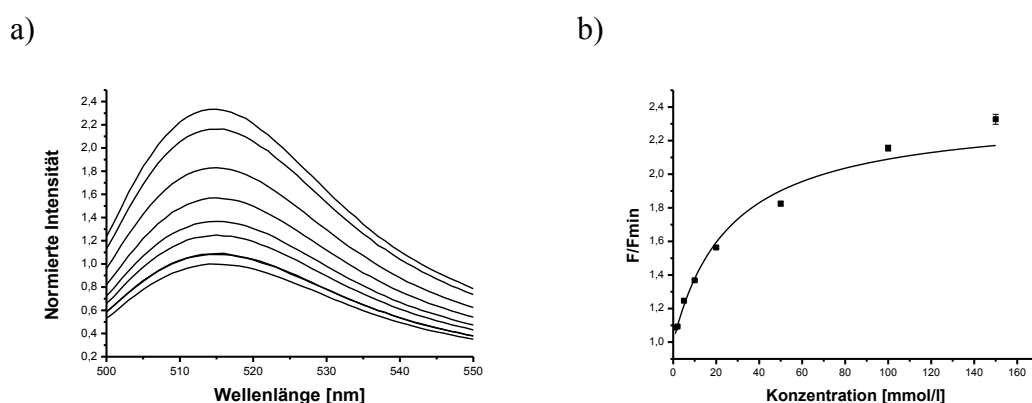


Abb. 39: Abhängigkeit der Fluoreszenz von **12 von der Natriumionenkonzentration.**

a) Fluoreszenzspektren von **12** (5 µM) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 150 mM Na⁺ (obere Kurve). b) Die relative Fluoreszenz F/F_{\min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

3.2.2.5 Messung der Fluoreszenzänderung von **12** in Gegenwart von Kaliumionen bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Die relative Fluoreszenz F/F_{\min} wurde gegen die Konzentration aufgetragen und die Anpassung der Parameter von Gleichung (7) ergab einen K_d -Wert von 32,8 mM mit $p = 0,7$ bzw. $F_{\max} = 1,7$. Der K_d -Wert in Gegenwart von KCl war damit deutlich größer als der berechnete K_d -Wert in Gegenwart von TMAcI.

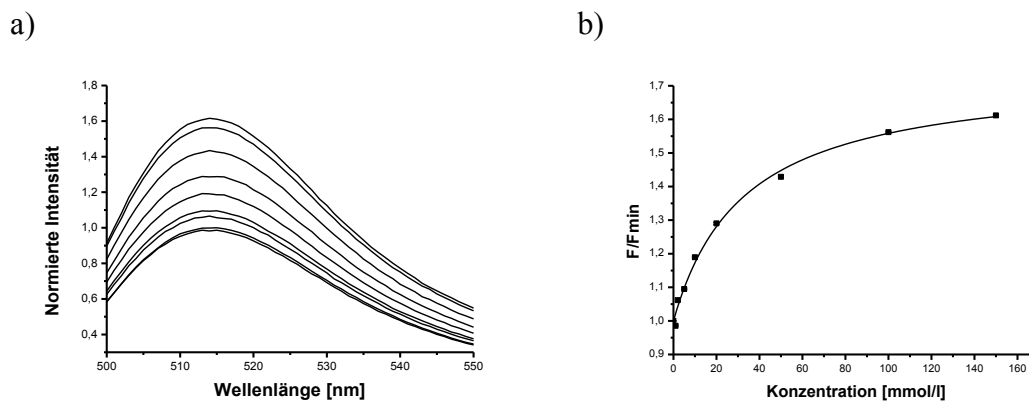


Abb. 40: Abhängigkeit der Fluoreszenz von **12 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von K^+ .**

a) Fluoreszenzspektren von **12** (5 μM) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50 und 100, 150 mM Na^+ (obere Kurve). b) Die relative Fluoreszenz F/F_{min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

3.2.2.6 Messung der Änderung der Fluoreszenzanregung von **12** in Gegenwart von K^+ bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Bei Derivat **12** wurde die Dissoziationskonstante auch über die Änderung der Fluoreszenzanregung, bei variablen Natriumionenkonzentrationen in Gegenwart von K^+ , gemessen. Es wurde ein K_d -Wert von 29,5 mM mit $p = 0,8$ und $F_{\text{max}} = 1,8$ berechnet. Wie erwartet, war der bestimmte K_d -Wert damit fast identisch zum K_d -Wert (32,8 mM), der sich aus der Fluoreszenzänderung von **12** in Gegenwart von K^+ bei variablen Na^+ -Konzentrationen ergab.

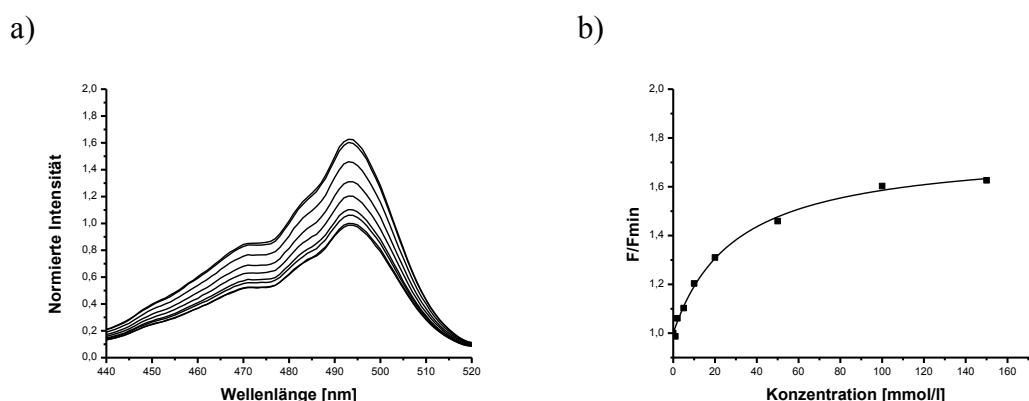


Abb. 41: Abhängigkeit der Fluoreszenzanregung von **12 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von K^+ .**

a) Fluoreszenzanregungsspektren von **12** (5 μM) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 150 mM Na^+ (obere Kurve). b) Die relative Fluoreszenzanregung F/F_{min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

3.2.3 Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur 14

Derivat **14** konnte nicht rein erhalten werden und die Substanz zeigte praktisch keine Änderung der Fluoreszenzintensität bei Natriumzugabe. Bis auf die Spektren wurde daher keine weitere Charakterisierung vorgenommen. Derivat **14** wies ein Absorptionsmaximum von 457 nm und Emissionsmaximum von 518 nm auf. Aus dem UV-Vis-Spektrum ergab sich $\epsilon = 1437 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 457 nm.

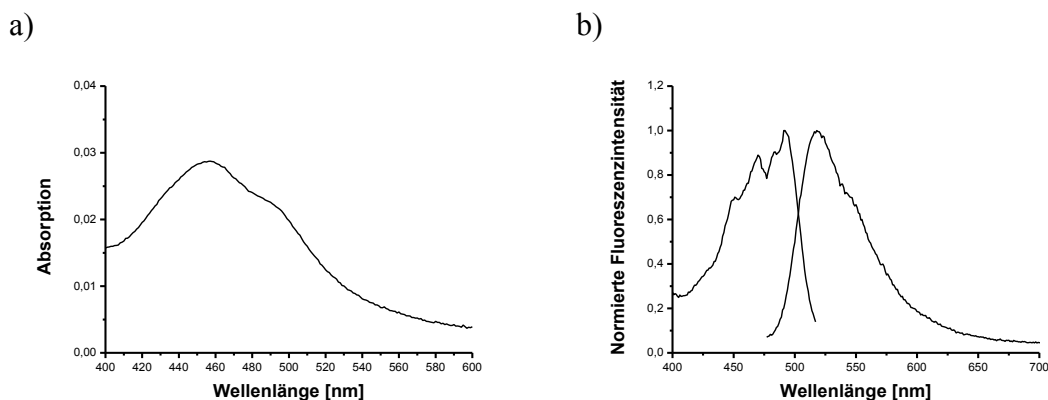


Abb. 42: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von 14.

Die Spektren von **14** (20 μM) wurden in einer 10 mM Hepes Lösung bei pH = 7,4 gemessen. a) Das UV-Vis-Spektrum wies ein Maximum bei 457 auf und der Extinktionskoeffizient betrug $1437 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (457 nm). b) Das normierte Fluoreszenzanregungsspektrum (linke Kurve) wies ein Maximum bei 492 nm auf, die Emission wurde bei 530 nm gemessen. Zur Messung der Fluoreszenzemissionsspektren (rechte Kurven) wurde bei 460 nm angeregt. Das Spektrum wurde auf 1 normiert und zeigte ein Maximum bei 518 nm. Es ergab sich eine Stokes-Verschiebung von $\Delta\lambda = 26 \text{ nm}$.

3.2.4 Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur 15

Derivat **15** konnte nicht rein erhalten werden und die Substanz zeigte einen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Natriumzugabe um das 1,4fache. Es wurden nur UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzspektren gemessen und Absorptions- (465 nm) und das Emissionsmaximum (520 nm) bestimmt. Aus dem UV-Vis-Spektrum ergab sich $\epsilon = 3174 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 465 nm.

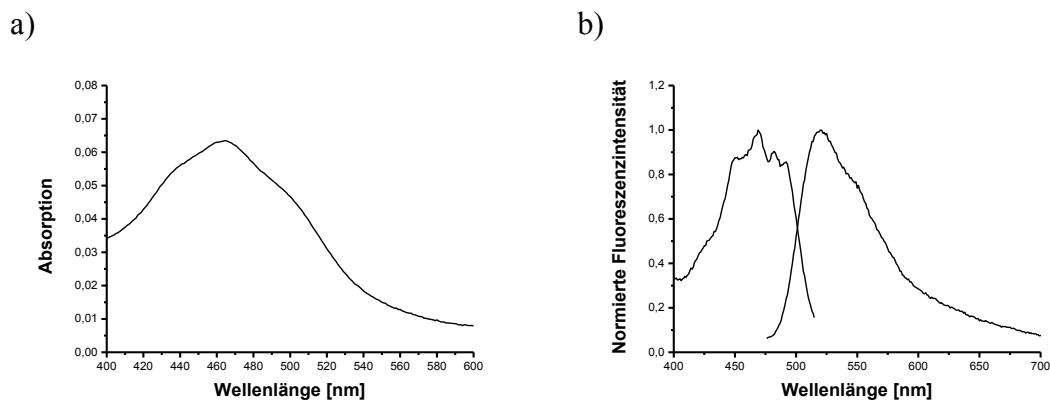


Abb. 43: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von 15.

Die Spektren von **15** (20 μM) wurden in einer 10 mM Hepes Lösung bei pH = 7,4 gemessen. a) Das UV-Vis-Spektrum wies ein Maximum bei 465 nm auf und der Extinktionskoeffizient betrug $3174 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (465 nm). b) Das normierte Fluoreszenzanregungsspektrum (linke Kurve) wies ein Maximum bei 469 nm auf, die Emission wurde bei 530 nm gemessen. Zur Messung der Fluoreszenzemissionsspektren (rechte Kurven) wurde bei 460 nm angeregt. Das Spektrum wurde auf 1 normiert und zeigte ein Maximum bei 520 nm.

3.2.5 Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur **19**

3.2.5.1 Messung der UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs-, Fluoreszenzemissionsspektren und der Quantenausbeute von **19**

Das Absorptionsspektrum zeigte eine relativ breite Bande mit einem Maximum bei 454 nm und einer Schulter bei etwa 490 nm (Abb. 44a). Es ergab sich ein Extinktionskoeffizient bei 454 nm von $18238 \text{ l M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Das Fluoreszenzanregungsspektrum zeigte ein Maximum bei 470 nm, ein Nebenmaximum bei 481 nm und Schultern bei 490, 460, 450 und 430 nm. Das Emissionsmaximum lag bei 519 nm (Abb. 44b). Für Derivat **19** wurde eine relative Quantenausbeute von 0,002 (0,2 %) in Abwesenheit von Na^+ und 0,006 (0,6 %) in Gegenwart von 150 mM Na^+ berechnet.

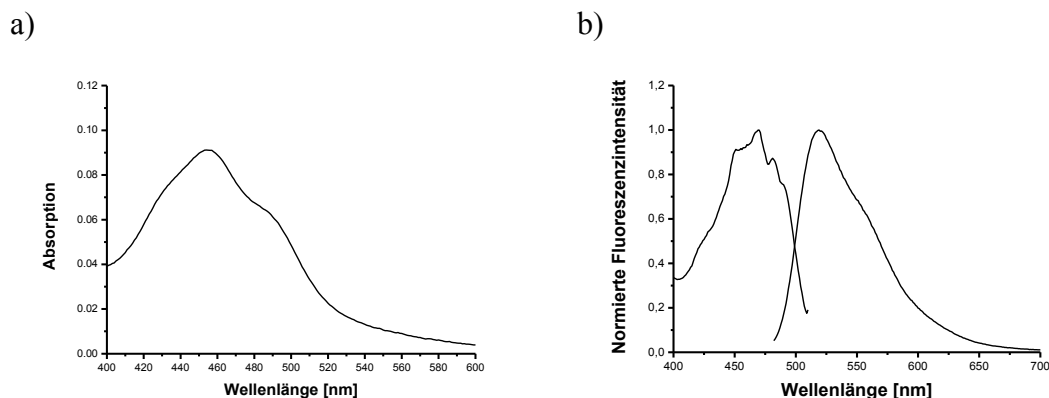


Abb. 44: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektrum von 19.

a) Das UV-Vis-Spektrum wies ein Maximum bei 454 nm auf und der Extinktionskoeffizient betrug $18238 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (454 nm). b) Das normierte Fluoreszenzanregungsspektrum (linke Kurve) wies ein Maximum bei 470 nm auf, die Emission wurde bei 530 nm gemessen. Zur Messung des Fluoreszenzemissionsspektrums (rechte Kurven) wurde bei 450 nm angeregt. Das Spektrum wurde auf 1 normiert und zeigte ein Maximum bei 519 nm. Es ergab sich eine Stokes-Verschiebung von $\Delta\lambda = 49 \text{ nm}$.

3.2.5.2 Messung der Fluoreszenzänderung von 19 bei variabler Kaliumionenkonzentration und bei verschiedenen pH-Werten

Derivat 19 wies nur eine sehr geringe K^+ -Abhängigkeit der Fluoreszenz auf (Abb. 45a) und zeigte im Gegensatz zu 12 eine geringe Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom pH-Wert (Abb. 45b).

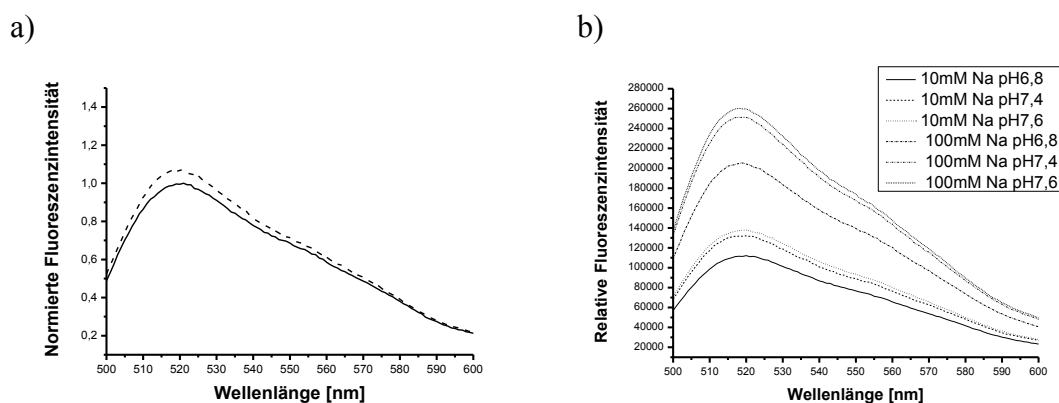


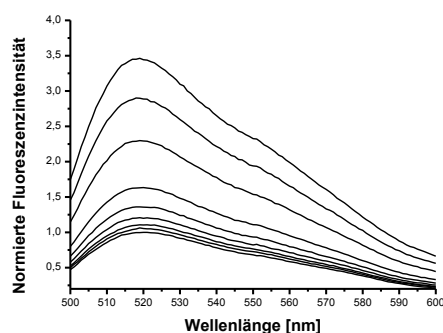
Abb. 45: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 19 von der Kaliumionenkonzentration und vom pH-Wert.

a) Fluoreszenzspektren von 19 ($5 \mu\text{M}$) in Gegenwart von 0 (untere Kurve) und 100 mM K^+ (obere Kurve). b) Fluoreszenzspektren von 19 ($5 \mu\text{M}$) in Gegenwart von 0 und 100 mM Na. Die Messungen wurden in Lösungen mit pH 6,8; 7,4 und 7,6 durchgeführt.

3.2.5.3 Messung der Fluoreszenzänderung von **19** in Gegenwart von TMACl bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Für Derivat **19** wurde ein K_d -Wert von 117 mM mit $p = 4,3$ bzw. $F_{\max} = 5,3$ berechnet. Im Gegensatz zu **12** zeigte **19** keine zeitliche Abhängigkeit der Fluoreszenz und konnte daher sofort nach Zugabe des Indikators zur Na^+ -Lösung vermessen werden.

a)



b)

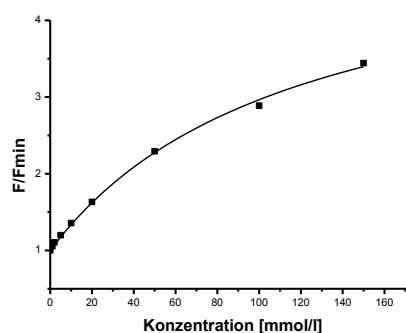


Abb. 46: Abhängigkeit der Fluoreszenz von **19 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von TMACl.**

a) Fluoreszenzspektren von **19** (5 μM) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 150 mM Na^+ (obere Kurve). b) Die relative Fluoreszenz F/F_{\min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

3.2.5.4 Messung der Fluoreszenzänderung von **19** in Gegenwart von Kaliumionen bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Der berechnete K_d -Wert von Derivat **19** betrug 125 mM mit $p = 4,3$ bzw. $F_{\max} = 5,3$. Der bestimmte K_d -Wert in Gegenwart von KCl war damit nur wenig größer als der berechnete Wert in Gegenwart von TMACl. Die maximale Änderung der Fluoreszenz war bei beiden Messungen identisch.

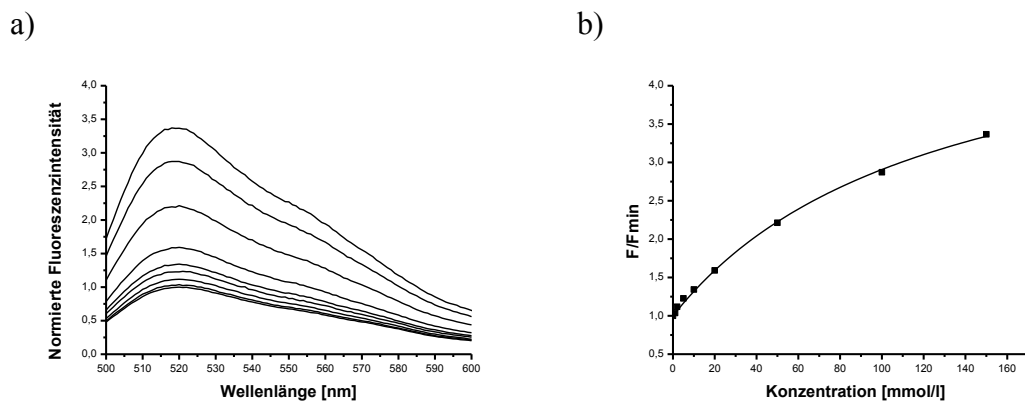


Abb. 47: Abhängigkeit der Fluoreszenz von **19 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von Kalium.**

a) Fluoreszenzspektren von **19** (5 µM) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 150 mM Na⁺ (obere Kurve). b) Die relative Fluoreszenz F/F_{min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

3.2.5.5 Messung der Änderung der Fluoreszenzanregung von **19** in Gegenwart von Kaliumionen bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Es wurde ein K_d-Wert von 131,4 mM mit p = 4,4 bzw. F_{max} = 5,4 berechnet. Der bestimmte K_d-Wert war damit, wie erwartet, fast identisch zum K_d-Wert (125 mM), der sich aus der Fluoreszenzänderung von **19** in Gegenwart von Kaliumionen bei variablen Natriumionenkonzentrationen ergab.

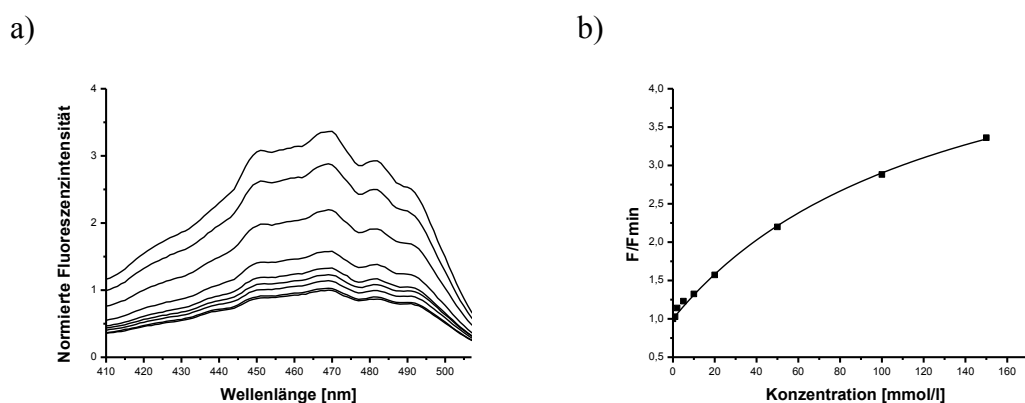


Abb. 48: Abhängigkeit der Fluoreszenzanregung von **19 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von Kaliumionen.**

a) Fluoreszenzanregungsspektren von **19** (5 µM) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 150 mM Na⁺ (obere Kurve). b) Die relative Fluoreszenzanregung F/F_{min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

3.2.6 Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur **17**

3.2.6.1 Messung der UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs-, Fluoreszenzemissionsspektren und der Quantenausbeute von **17**

Das Absorptionsspektrum von **17** zeigte eine relativ breite Bande mit einem Maximum bei 458 nm und einer Schulter bei etwa 485 nm (Abb. 49a). Es wurde ein Extinktionskoeffizient von $13324 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 458 nm berechnet. Das Fluoreszenzanregungsspektrum zeigte ein Maximum bei 470 nm, zwei Nebenmaxima bei 480 und 450 nm und Schultern bei 490 und 420 nm. Das Emissionsmaximum betrug 519 nm. Für Derivat **17** wurde eine relative Quantenausbeute von 0,002 (0,2 %) in Abwesenheit von Na^+ und 0,032 (3,2 %) in Gegenwart von 150 mM Na^+ berechnet.

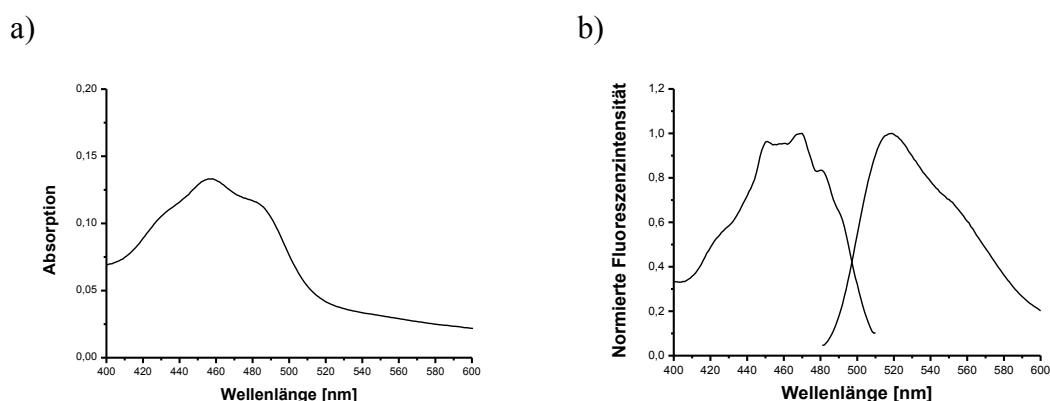


Abb. 49: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektrum von **17**.

a) Das UV-Vis-Spektrum von **17** ($10 \mu\text{M}$) wies ein Maximum bei 458 nm auf und der Extinktionskoeffizient betrug $13324 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (458 nm). b) Das normierte Fluoreszenzanregungsspektrum (linke Kurve, $5 \mu\text{M}$ **17**) wies ein Maximum bei 470 nm auf, die Emission wurde bei 530 nm gemessen. Zur Messung des Fluoreszenzemissionsspektrums (rechte Kurven, $5 \mu\text{M}$ **17**) wurde bei 450 nm angeregt. Das Spektrum wurde auf 1 normiert. Das Maximum lag bei 519 nm. Es ergab sich eine Stokes-Verschiebung von $\Delta\lambda = 49 \text{ nm}$.

3.2.6.2 Messung der Fluoreszenzänderung von **17** bei variabler

Kaliumionenkonzentration und bei verschiedenen pH-Werten

Die Messung der Fluoreszenzänderung ohne Na^+ bei 0 mM und 100 mM K^+ zeigte, dass keine Kaliumabhängigkeit der Fluoreszenz bestand (Abb. 50a). Derivat **17** zeigte eine geringe Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom pH-Wert (Abb. 50b).

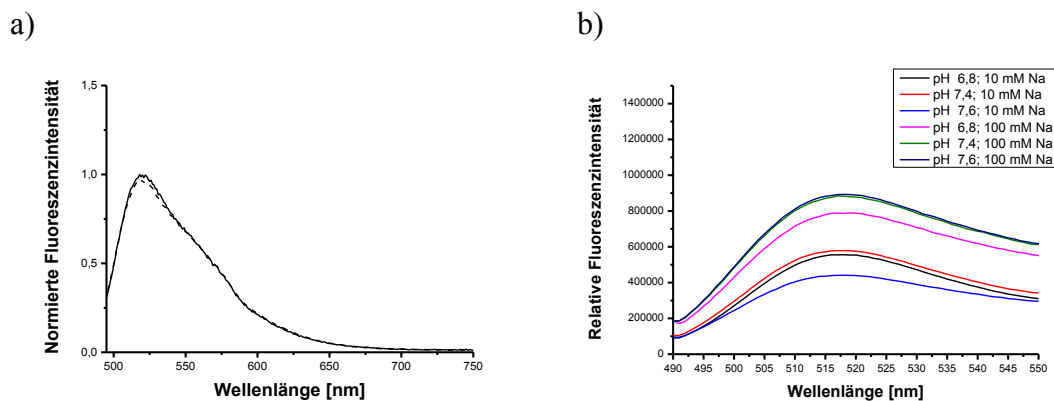


Abb. 50: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 17 von der Kaliumionenkonzentration und vom pH-Wert.

a) Fluoreszenzspektren von **17** (5 μ M) in Gegenwart von 0 (untere Kurve) und 100 mM K^+ (obere Kurve).
 b) Fluoreszenzspektren von **17** (5 μ M) in Gegenwart von 0 und 100 mM Na. Die Messungen wurden in Lösungen mit pH 6,8; 7,4 und 7,6 durchgeführt.

3.2.6.3 Messung der Fluoreszenzänderung von **17** in Gegenwart von TMACl bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Derivat **17** zeigte in Gegenwart von TMACl eine sehr starke Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Natriumionenkonzentration. Es wurde die relative Fluoreszenz F/F_{\min} gegen die Konzentration aufgetragen und die Anpassung der Parameter von Gleichung (7) ergab $K_d = 42,5$ mM mit $p = 15,9$ bzw. $F_{\max} = 16,9$. Im Gegensatz zu **13** zeigte **17** keine zeitliche Abhängigkeit der Fluoreszenz und konnte daher sofort nach Zugabe des Indikators zur Na^+ -Lösung vermessen werden.

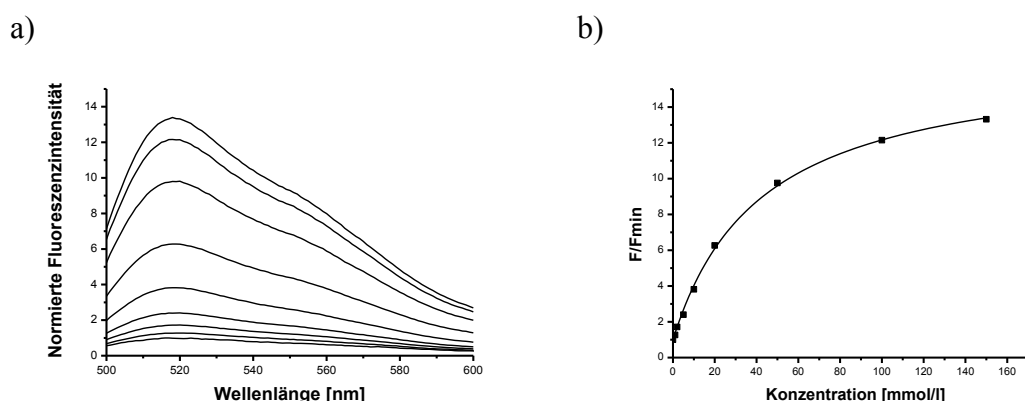


Abb. 51: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 17 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von TMACl.

a) Fluoreszenzspektren von **17** (5 μ M) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 150 mM Na^+ (obere Kurve). b) Die relative Fluoreszenz F/F_{\min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

3.2.6.4 Messung der Fluoreszenzänderung von **17** in Gegenwart von Kaliumionen bei variablen Natriumionenkonzentrationen

Derivat **17** zeigte in Gegenwart von Kaliumionen ebenfalls eine sehr starke Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Natriumionenkonzentration. Es wurde ein K_d -Wert von $K_d = 48$ mM mit $p = 17,9$ bzw. $F_{\max} = 18,9$ ermittelt. Der bestimmte K_d -Wert war damit kaum höher als der berechnete Wert in Gegenwart von TMACl.

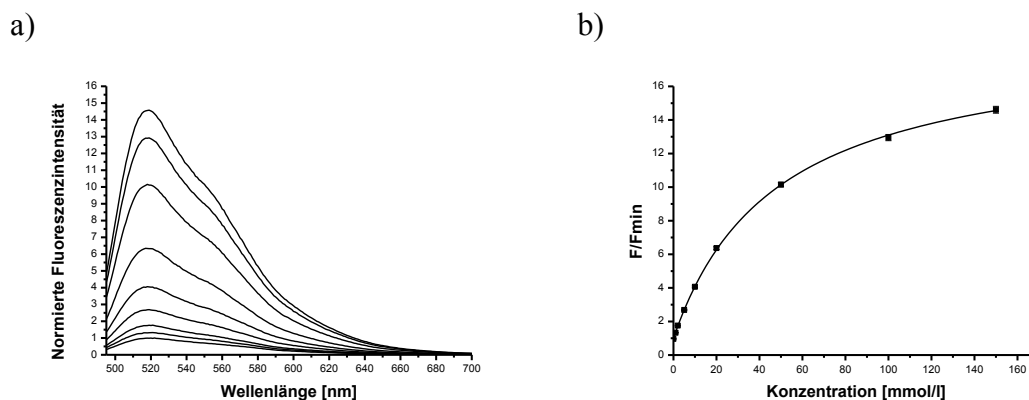


Abb. 52: Abhängigkeit der Fluoreszenz von **17 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von K.**

a) Fluoreszenzspektren von **17** (5 μ M) in Gegenwart von 0 (untere Kurve), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 150 mM Na^+ (obere Kurve). b) Die relative Fluoreszenz F/F_{\min} wurde gegen die Natriumionenkonzentration aufgetragen.

3.2.7 Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur **23**

Derivat **23** konnte rein erhalten werden, aber die Substanz zeigte keine Änderung der Fluoreszenz bei Natriumzugabe. Daher wurde, bis auf die Spektren, keine weitere Charakterisierung vorgenommen. Das UV-Vis-Spektrum zeigte bei 457 und 355 nm Absorptionsmaxima und das Emissionsmaximum betrug 520 nm. Aus dem UV-Vis-Spektrum ergaben sich $\epsilon = 21085 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 457 nm und $\epsilon = 38443 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 355 nm. Für Derivat **23** wurde eine relative Quantenausbeute von 0,002 (0,2 %) in Abwesenheit von Na^+ berechnet.

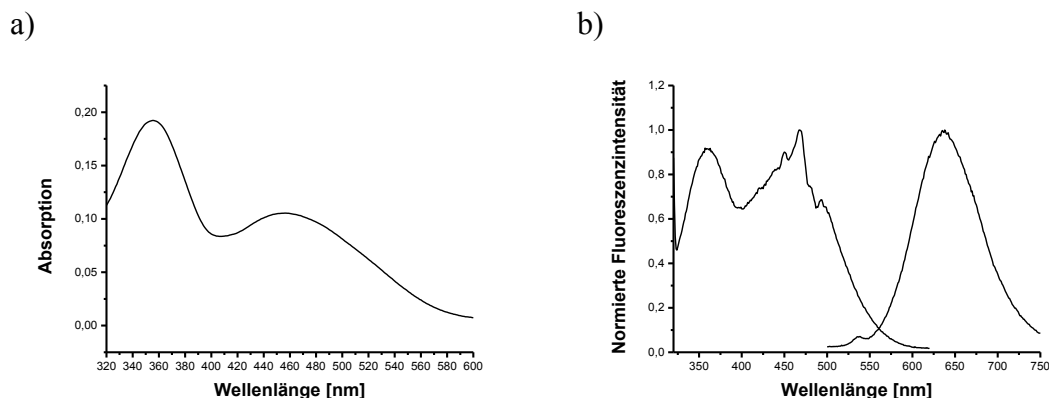


Abb. 53: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von 23.

a) Das UV-Vis-Spektrum wies Maxima bei 457 und 355 nm auf und die Extinktionskoeffizienten betrugen $21085 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (457 nm) und $38443 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (355 nm). b) Das normierte Fluoreszenzanregungsspektrum (linke Kurve) wies Maxima bei 468 nm und 359 nm auf, die Emission wurde bei 640 nm gemessen. Zur Messung der Fluoreszenzemissionsspektren (rechte Kurve) wurde bei 450 nm angeregt. Das Spektrum wurde auf 1 normiert und zeigte ein Maximum bei 638 nm.

3.2.8 Untersuchung der Ionophor-7-Farbstoffstruktur 21

Da Derivat **21** nicht rein erhalten und die Substanz keine Änderung der Fluoreszenzintensität bei Natriumzugabe zeigte, wurde, bis auf die Messung der Spektren, keine weitere Charakterisierung vorgenommen. Das UV-Vis-Spektrum wies ein Absorptionsmaximum bei 358 nm und eine Schulter bei 420 - 430 nm auf. Das Emissionsmaximum lag bei 570 nm.

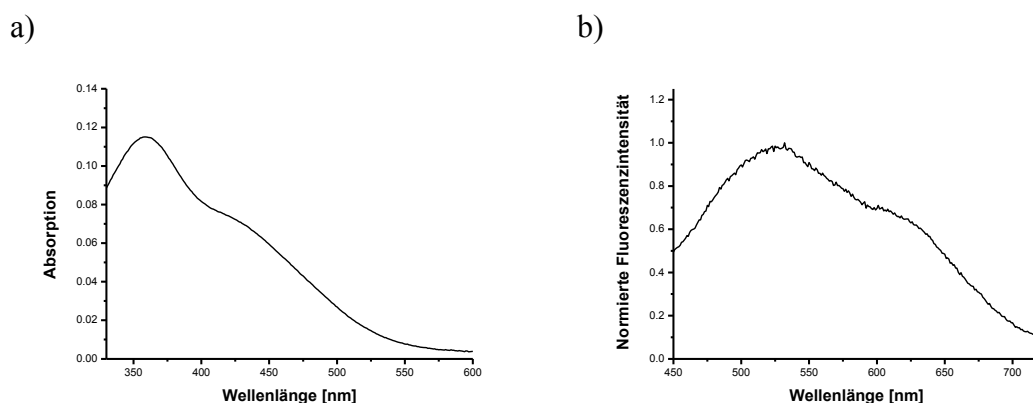


Abb. 54: UV-Vis- und Fluoreszenzemissionsspektren von 21.

a) Das UV-Vis-Spektrum wies ein Maximum bei 358 nm und eine Schulter bei 420 - 430 nm auf. b) Zur Messung des Fluoreszenzemissionsspektrums (rechte Kurve) wurde bei 370 nm angeregt. Das Emissionsspektrum wurde auf 1 normiert und zeigte ein Maximum bei 532 nm.

3.2.9 Diskussion

Die wichtigsten Eigenschaften der Indikatoren **12**, **13**, **19** und **17** (Abb. 55) und der kommerziellen Sensoren Sodium Green, Asante NaTRIUM Green 2 und SBF1 wurden in Tab. 2 zusammengefasst. Ein Problem, welches sich bei den ersten K_d -Messungen zeigte, war die Zeit- und pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz. Sie trat bei den Indikatoren **12** und **13** auf und wurde für **13** genauer untersucht. Durch Puffern der Lösungen und Messung der Fluoreszenz zu einem festen Zeitpunkt nach der Natriumzugabe, konnten die K_d -Werte der beiden Derivate bestimmt werden. Der Grund für die Zeit- und pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz ist vermutlich die phenolischen Hydroxygruppen der Verbindungen. Um diese Abhängigkeiten zu verringern bzw. zu unterbinden, wurden die Hydroxygruppen alkyliert. Zuerst wurden die Methylderivate **14** und **15** hergestellt, deren Reinigung unvollständig blieb. Die Synthese der Methylencarboxy-Derivate **17** und **19** gelang und beide Derivate zeigten keine Zeitabhängigkeit und nur eine geringe pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz.

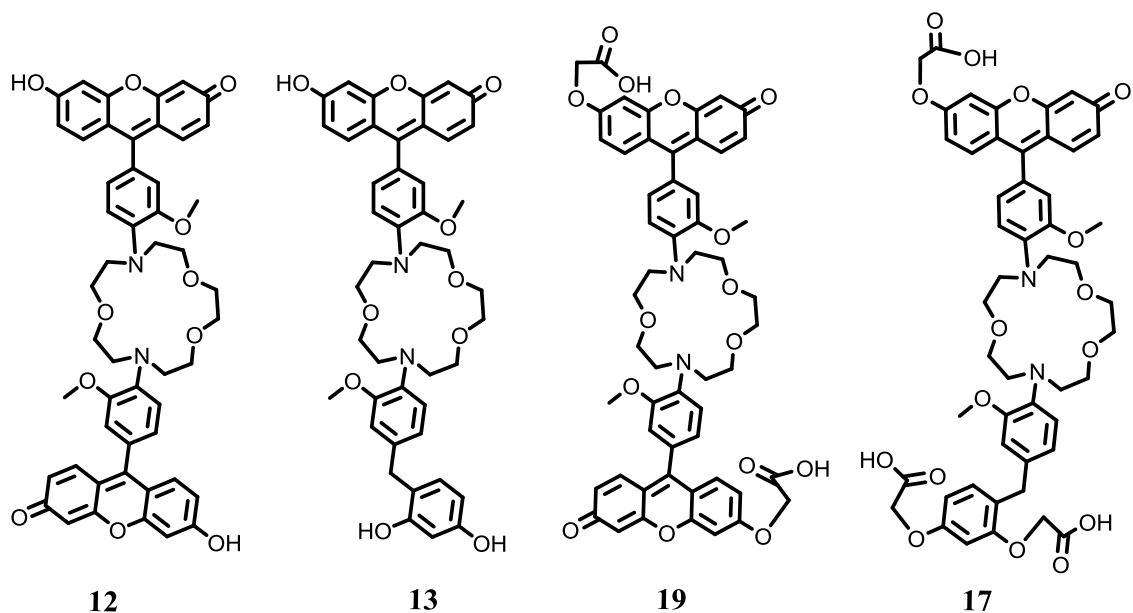


Abb. 55: Strukturen der Natriumindikatoren 12,13, 19 und 17.

Ergebnisse und Diskussion

Tab. 2 Eigenschaften der Natriumindikatoren 13, 12, 19 und 17, SG (Sodium Green)^{9, 47, 48}, ANG 2 (Asante NaTRIUM Green 2)^{13, 49} und SBFI.⁸

Die Messungen wurden in 10 mM Hepes-Lösung bei pH 7,4 durchgeführt.

Indikator	13	12	19	17	SG	ANG 2	SBFI
$\lambda_{\text{max, ex}}$ [nm]	494	494	470	470	505	517	346/334
$\lambda_{\text{max, em}}$ [nm]	514	514	519	519	530	540	551/525
ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	15940	25281	18238	13324	117000	91000	45000
Stokes Shift [nm]	20	20	49	49	25	23	-
Φ (0 mM Na ⁺ / 150 mM Na ⁺) [%]	0,2/ 1,2	0,5/ 0,3	0,2/ 0,6	0,2/ 3,2	n.v./ 20	1,4/ 20	4,5/ 8,3
Brightness ($\epsilon \cdot \Phi$, 0 mM Na ⁺ /150 mM Na ⁺) [M ⁻¹ cm ⁻¹]	32/ 191	126/ 76	36/ 109	27/ 426	n.v./ 23400	1274/ 18200	2025/ 3735
K_d (Na ⁺ + TMA ⁺) [mmol/l]	10	16,3	117	42,5	8,4	20	7,4
F_{max} (Na ⁺ + TMA ⁺)	8	2	5,3	16,9	6,7	16	n.v.
K_d (Na ⁺ + K) [mmol/l]	25,4	32,8	125	48	20	n.v.	18
F_{max} (Na ⁺ + K ⁺)	4,8	1,7	5,3	18,9	n.v.	n.v.	n.v.
F (100 mM K ⁺)/ F (0 mM K ⁺)	1,2	1,1	1,05	1	n.v.	n.v.	n.v.
Zeitabhängigkeit der Fluoreszenz	+	+	Ø	Ø	n.v.	n.v.	n.v.
pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz	+	+	gering	gering	n.v.	n.v.	n.v.

Es wurden zwei verschiedene K_d -Werte für die Indikatoren ermittelt. Der in Gegenwart von TMACl berechnete K_d -Wert wird meist in der Literatur zu Natriumindikatoren angegeben. Das Tetramethylammoniumion ist sehr groß und kann nicht mit dem Ionophor wechselwirken, es dient dazu, die Gesamtionenstärke konstant zu halten. Dem gegenüber kann das Kaliumion mit dem Ionophor wechselwirken, dadurch wird die Dissoziationskonstante des Natrium-Ionophor-Komplexes erhöht. Der in Gegenwart von Kaliumionen berechnete K_d -Wert, ist meist größer und ähnelt dem tatsächlichen K_d -Wert in der Zelle.

Das unsymmetrische Derivat **13** wies die geringste Dissoziationskonstante $K_d = 10 \text{ mM}$ ($\text{Na}^+ + \text{TMA}^+$) von allen untersuchten Indikatoren auf. Sie lag damit im Bereich der Dissoziationskonstante des Sodium Greens (SG) und des SBFIs und war deutlich kleiner als der K_d -Wert des Asante NaTRIUM Green 2 (ANG 2). Die Dissoziationskonstante in Gegenwart von KCl betrug $25,4 \text{ mM}$ und war damit nur wenig größer als die des Sodium Greens und des SBFIs. Die maximale Fluoreszenzänderung ($F_{\text{max}} = 8$) von **13** war größer als die des SGs aber deutlich kleiner als von ANG 2. In Gegenwart von KCl war F_{max} mit $4,8$ deutlich kleiner. Die Fluoreszenz erhöhte sich mit K^+ (100 mM K^+) um das 1,2fache. Die ermittelte Quantenausbeute von **13** war geringer als die QA von SG, ANG 2 und SBFI. Sie zeigte aber eine deutliche Natriumabhängigkeit und erhöhte sich von $0,2 \%$ (0 mM Na^+) auf $1,2 \%$ (150 mM Na^+). Da auch der molare Extinktionskoeffizient (ϵ) sehr klein war, ergab sich für **13** eine geringe *Brightness* ($\epsilon \cdot \Phi$).

Das symmetrische Derivat **12** wies deutlich größere Dissoziationskonstanten $K_d = 16,3 \text{ mM}$ ($\text{Na}^+ + \text{TMA}^+$) und $K_d = 32,8 \text{ mM}$ ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) auf. Die Änderung der Fluoreszenz war auch deutlich geringer, $F_{\text{max}} = 2$ ($\text{Na}^+ + \text{TMA}^+$) bzw. $F_{\text{max}} = 1,7$ ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$).

Die Alkylierung der Indikatoren **12** und **13** hatte mehrere Effekte. Wie erwartet zeigten beide Methylencarboxy-Derivate **17** und **19** keine Zeitabhängigkeit und nur eine geringe pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz. Aber entgegen den Erwartungen beeinflusste die Alkylierung auch den K_d -Wert. Die Dissoziationskonstante des unsymmetrischen Derivats **17** betrug in Gegenwart von TMAcI $42,5 \text{ mM}$ und in Gegenwart von KCl 48 mM . Damit war die Dissoziationskonstante von **17** in Gegenwart von TMAcI mehr als 4-mal größer als die Dissoziationskonstante von **13**, obwohl sich beide Strukturen kaum unterscheiden. Bei den Dissoziationskonstanten in Gegenwart von KCl war der Unterschied deutlich geringer (1,9fach). Eine Kaliumabhängigkeit der Fluoreszenz war bei **17** nicht vorhanden. Derivat **17** wies damit eine deutlich größere Natriumselektivität als **13** auf. Die Ursache war wahrscheinlich eine sterische Abschirmung des Ionophors bei **17** durch die Methylencarboxygruppen, was zum einen eine Erhöhung des K_d -Wertes und zum anderen eine Erhöhung der Natriumselektivität mit sich brachte. Das unsymmetrische Derivat **17** zeigte mit Abstand die größte Fluoreszenzänderung, mit $F_{\text{max}} = 17$ ($\text{Na}^+ + \text{TMA}^+$) und $F_{\text{max}} = 19$ ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$). Die Quantenausbeute von **17** zeigte ähnlich wie bei **13** eine starke Abhängigkeit von der Natriumionenkonzentration. Sie

Ergebnisse und Diskussion

erhöhte sich von 0,2 % (0 mM Na⁺) auf 3,2 % (150 mM Na⁺) und erhöhte sich damit auf das 16fache. Auf Grund des ebenfalls geringen ϵ ergab sich eine geringe *Brightness*. Die Dissoziationskonstante, die QA und die *Brightness* von **17** waren deutlich schlechter als die von SG, ANG 2 und SBFI, aber die Natriumselektivität und F_{\max} waren deutlich größer als bei allen anderen Indikatoren.

Analog zu **12** und **13** wies das symmetrische Methylencarboxy-Derivat **19** einen größeren K_d -Wert und eine geringere Fluoreszenzänderung als **17** auf. Bei **19** betrug die Dissoziationskonstante $K_d = 117$ mM (Na⁺ + TMA⁺) und war damit nur wenig geringer als die in Gegenwart von KCl bestimmte Dissoziationskonstante von 125 mM. Somit bewirkte die Alkylierung, wie bei **17**, eine Erhöhung des K_d -Wertes bei gleichzeitiger Erhöhung der Natriumselektivität. Bei **19** stieg im Vergleich zu **12** der K_d -Wert um das 7fache (Na⁺ + TMA⁺) bzw. um das 3,8fache (Na⁺ + K⁺). Derivat **17** zeigte ebenfalls eine größere Fluoreszenzänderung mit $F_{\max} = 5,3$ in Gegenwart von TMAcI und KCl.

3.3 Synthese von [2.1.1]-basierenden Natriumindikatoren

3.3.1 Synthesestrategie für [2.1.1]-basierende Natriumindikatoren

Ein weiteres Ionophor, auf dessen Basis, Ionenindikatoren hergestellt werden können, sind die Kryptanden (vgl. Abschnitt 2, Punkt 2). Wie einleitend erläutert (Abschnitt 1.4.5) erscheint das [2.1.1]-Derivat als Basis für einen Indikator am besten geeignet. Die Synthese geht von Diaza[15]Krone-5 und Iminodiessigsäure-Derivaten aus. Diaza[15]Krone-5 kann kommerziell, unter dem Markennamen Kryptofix[®] 21, erworben oder synthetisiert werden.^{50, 51} Da Kryptofix[®] sehr teuer ist, wurde hier zuerst der Versuch unternommen, es selber zu synthetisieren. Neben Diaza[15]Krone-5 wurden verschiedene Iminodiessigsäure-Derivate hergestellt. Um aus diesen Verbindungen [2.1.1]-Strukturen zu erhalten, wurden 3 Synthesestrategien verfolgt:

- I. Ein Iminodiessigsäure-Derivat, mit einer funktionellen Gruppe, wurde mit Diaza[15]Krone-5 zu einem [2.1.1]-Derivat umgesetzt. Das [2.1.1]-Derivat wurde hydriert, dann erfolgte die Synthese der Fluoreszenzfarbstoffe an der funktionellen Gruppe. Es besteht auch die Möglichkeit am [2.1.1]-Derivat erst Fluoreszenzfarbstoffe aufzubauen und diese im Anschluss zu hydrieren (Abb. 56a). Beide Synthesewege wurden verfolgt.
- II. Ein N-geschütztes Iminodiessigsäure-Derivat wurde mit Diaza[15]Krone-5 zu einem entsprechenden [2.1.1]-Derivat umgesetzt. Nach der Hydrierung und dem Entschützen des [2.1.1]-Derivates kann ein Fluoreszenzfarbstoff am Stickstoff gebunden werden (Abb. 56b).
- III. Ein Fluoreszenzfarbstoff mit Iminodiessigsäure-Gruppe wurde mit Diaza[15]Krone-5 zu einem entsprechenden [2.1.1]-Derivat umgesetzt, welches im Anschluss hydriert werden kann (Abb. 56c).

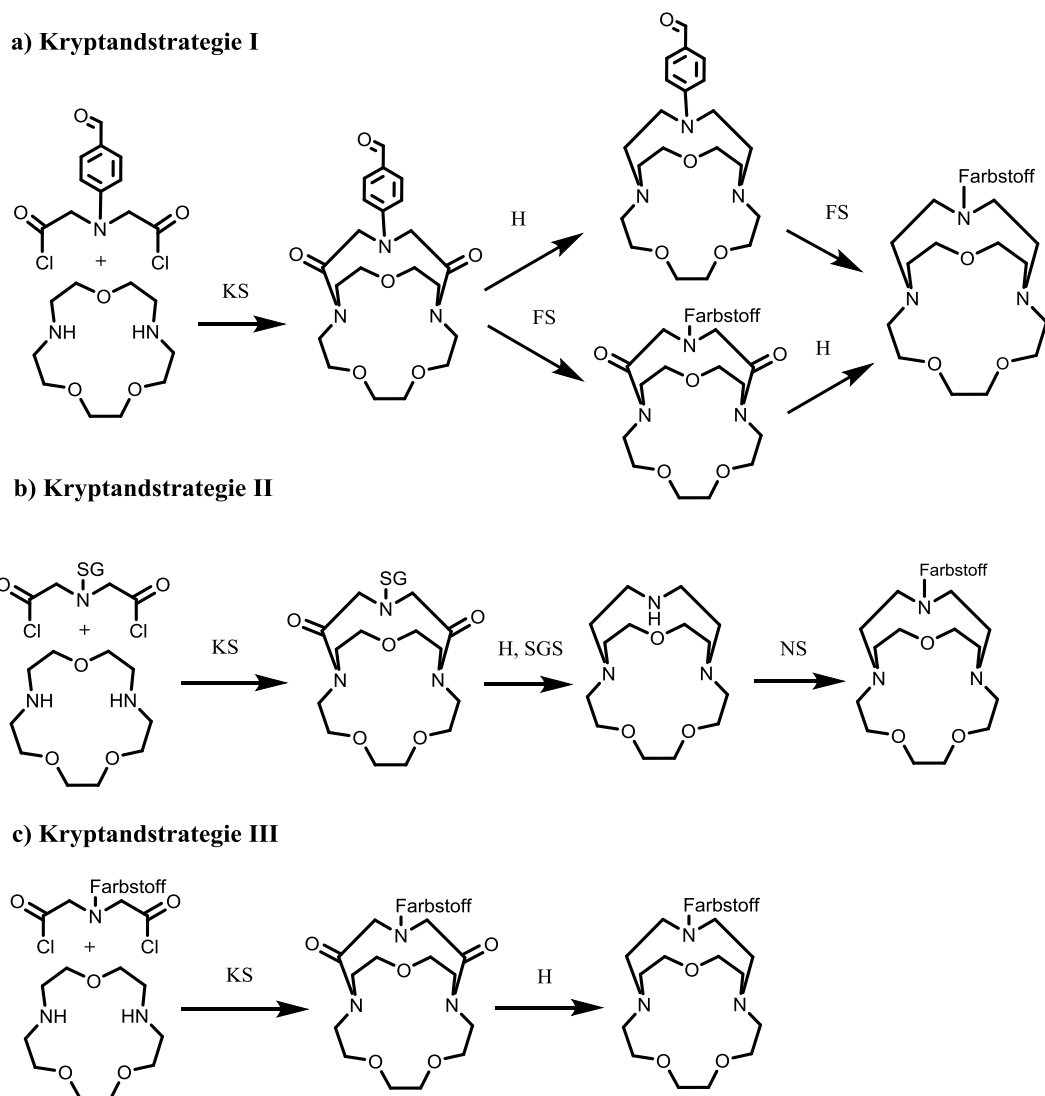


Abb. 56: Allgemeine Synthesestrategien für die Kryptandsynthese:

Kryptandstrategie I – III mit den Abkürzungen: KS: Kryptandsynthese, H: Hydrierung, FS: Farbstoffsynthese, SGS: Schutzgruppenspaltung, NS: nukleophile Substitution.

3.3.2 Synthese von Diaza-Kronenethern

Der erste Weg um Diaza-Kronenether herzustellen, ist die Synthese über die *Williamson-Ethersynthese* aus einem Diamin und einem Dielektrophil. Der zweite Weg ist die Synthese der Diaza-Kronenether über Umesterung, aus einem Dimethylester und einem Diamin. Da die Aminogruppen nicht geschützt werden müssen und einer der Ausgangsstoffe, das 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan, kommerziell verfügbar und günstig ist, scheint die Synthese über die Umesterung der effektivere Syntheseweg zu sein. Für den zweiten Synthesebaustein wurden Picolin- und Glycolsäure zum Methylester umgesetzt und diese anschließend jeweils mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan in hoher

Verdünnung in trockenem Methanol bei RT gerührt. Da der Glycolsäuredimethylester **1** deutlich weniger reaktiv war, wurde bei der Cyclisierung Natriummethanolat (MeONa) zugegeben, welches, wie auch von Gryko et al. beschrieben, die Reaktionszeit auf 24 h senkte und die Ausbeute auf 74 % erhöhte.⁵¹ Anschließend wurden beide Produkte hydriert.^{32, 50} Derivat **3** konnte sowohl mit LiAlH₄ als auch mit BH₃ hydriert werden, während **4** nur mit BH₃ hydriert werden konnte. Die erhaltenen Diaza-Kronenether konnten leicht durch Extraktion mit siedendem Heptan gereinigt werden. Zwar konnte die Ausbeute von **5** nicht signifikant erhöht werden, jedoch wurde für **6** ein neuer Syntheseweg erschlossen (Abb. 57).

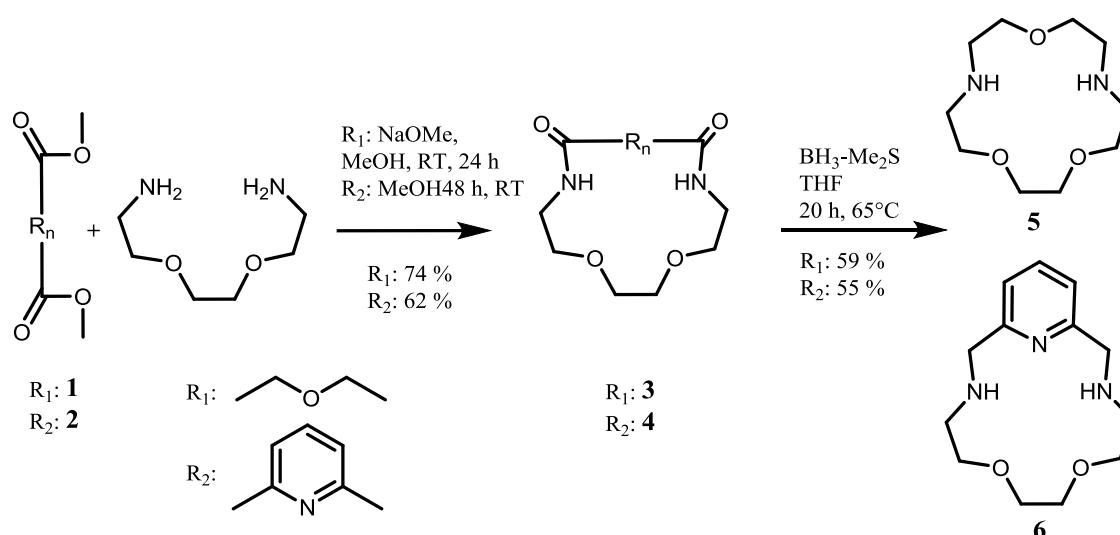


Abb. 57: Synthese der Diaza-Kronenether 5 und 6.

Die Methylester **1** und **2** wurden zu den cyclischen Diamiden **3** und **4** umgesetzt und im Anschluss hydriert.

3.3.3 Kryptandstrategie I - Synthese einer [2.1.1]-Struktur mit funktioneller Gruppe, Hydrierung und Synthese von [2.1.1]-Farbstoff-Strukturen

3.3.3.1 Synthese einer [2.1.1]-Struktur mit funktioneller Gruppe

Um das benötigte Iminodiessigsäure-Derivat mit einer funktionellen Gruppe zu erhalten, wurde Anilin mit *tert*-Butylbromacetat zu **30** umgesetzt.³⁹ Derivat **30** wurde einer *Vilsmeier-Formylierung*⁵² unterzogen und die *tert*-Butylester-Gruppen von **31** wurde mit TFA abgespalten (Abb. 58).

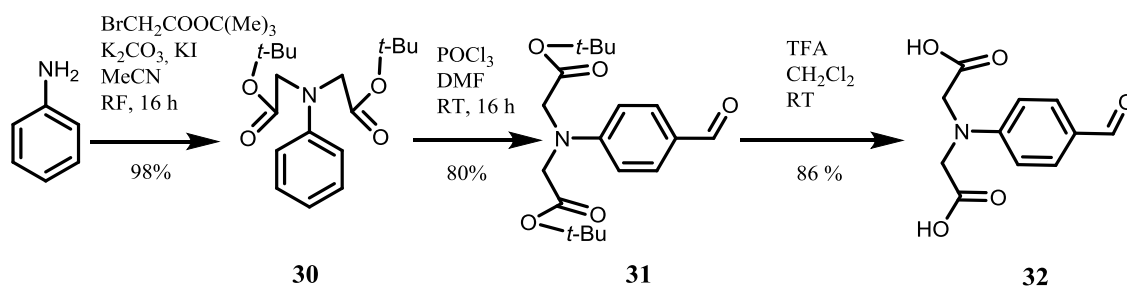


Abb. 58: Umsatz von Anilin mit *tert*-Butylbromacetat zu **30** mit anschließender *Vilsmeier-Formylierung* zu **31**.

Synthese des Iminodiessigsäure-Derivates aus **31** durch Esterspaltung mit TFA.

Das erhaltene Produkt **32** ließ sich leicht in das Säurechlorid überführen und wurde mit Diaza-[15]Krone-5 **5** nach der im Kapitel 3.3.4 beschriebenen Synthesemethode von Wanichacheva et al. verestert.⁵³ Es entstand das Kryptandderivat **34** in guten Ausbeuten (Abb. 59).

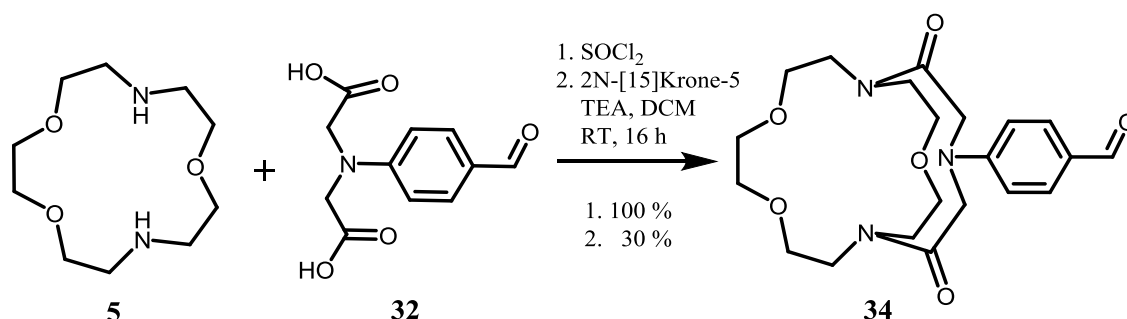


Abb. 59: Synthese von [2.1.1]-Derivat **34** aus **32** und Diaza-[15]Krone-5 **37**.

Derivat **34** ist eine wichtige Verbindung, da mit Hilfe der Aldehydgruppe theoretisch eine Vielzahl von Farbstoffen aufgebaut werden kann. Nach einer Vorreinigung durch Extraktion schlossen sich zwei Säulenchromatographien an, **34** konnte mit 20 - 30 % Ausbeute erhalten werden. Die gereinigte Verbindung wurde mit MS, HR-MS und NMR untersucht und eine Probe der Substanz wurde weiter über präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt. Das sonst braune Harz kristallisierte nach längerer Zeit, so dass die Kristallstruktur bestimmt werden konnte. Derivat **34** kristallisierte in braunen Kristallen in der Raumgruppe $P\bar{1}$. Der aromatische Ring bildet mit der Aldehydgruppe; N3, C12 und C13 eine Ebene und die Kryptandstruktur formt eine, daran gebundene „Schüssel“ (Abb. 60).

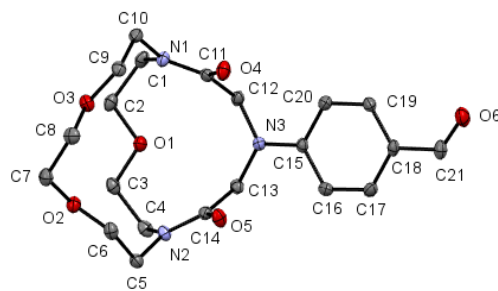


Abb. 60: Kristallstruktur von **34**; ausgewählte Bindungsabstände [Å] und Winkel [°]:

N1-C11 1,350(2), N1-C10 1,471(3), N1-C1 1,468(2), N3-C15 1,377(2), O4-C11 1,232(2), O6-C21 1,196(3), C11-N1-C1 125,56(17), C11-N1-C10 116,76(16), C1-N1-C10 117,46(15), C15-N3-C12 121,82(12).

3.3.3.2 Hydrierung der [2.1.1]-Struktur **34**

Das Hauptproblem bei der Hydrierung ist, dass in der Struktur **34** gleichzeitig zwei Amidgruppen und eine Aldehydfunktion vorhanden sind. Es müssen gleichzeitig die Amidgruppen reduziert werden, während die Aldehydgruppe erhalten bleibt (vgl. Abschnitt 3.3.1, Punkt I). Hydrierungsreagenzien, die meist bei Kryptanden Verwendung finden, sind LiAlH_4 und Boran. Ersteres kommt nicht in Frage wegen der Lithiumionen, die eine hohe Affinität für [2.1.1] aufweisen (vgl. Abschnitt 1.4.5, Abb. 13). Boran reduzierte in einem Versuch zwar die Amidgruppen, allerdings auch die Aldehydgruppe zur Methylgruppe (Abb. 61). Die Methylgruppe des entstandenen [2.1.1]-Derivates **36** ließ sich nicht wieder in eine Aldehydgruppe umwandeln (Abb. 61). Um die [2.1.1]-Struktur **34** mit Boran hydrieren zu können, muss die Aldehydgruppe geschützt werden. Derivat **34** wurde entsprechend verschiedener Vorschriften mit Glykol unter verschiedenen Bedingungen umgesetzt, es konnte kein Acetal isoliert und somit nicht mit Boran hydriert werden (Abb. 61).⁵⁴⁻⁵⁶ Als nächstes wurde versucht, den Kryptand anders aufzubauen um das Problem mit der Aldehydgruppe zu umgehen. Hierzu wurde N-Phenyl-iminodiessigsäure **37** hergestellt, mit Thionylchlorid zum Säurechlorid überführt und mit Diaza-[15]Krone-5 **5** umgesetzt. Trotz mehrerer Versuche konnte kein entsprechender Kryptand identifiziert oder isoliert werden (Abb. 61).

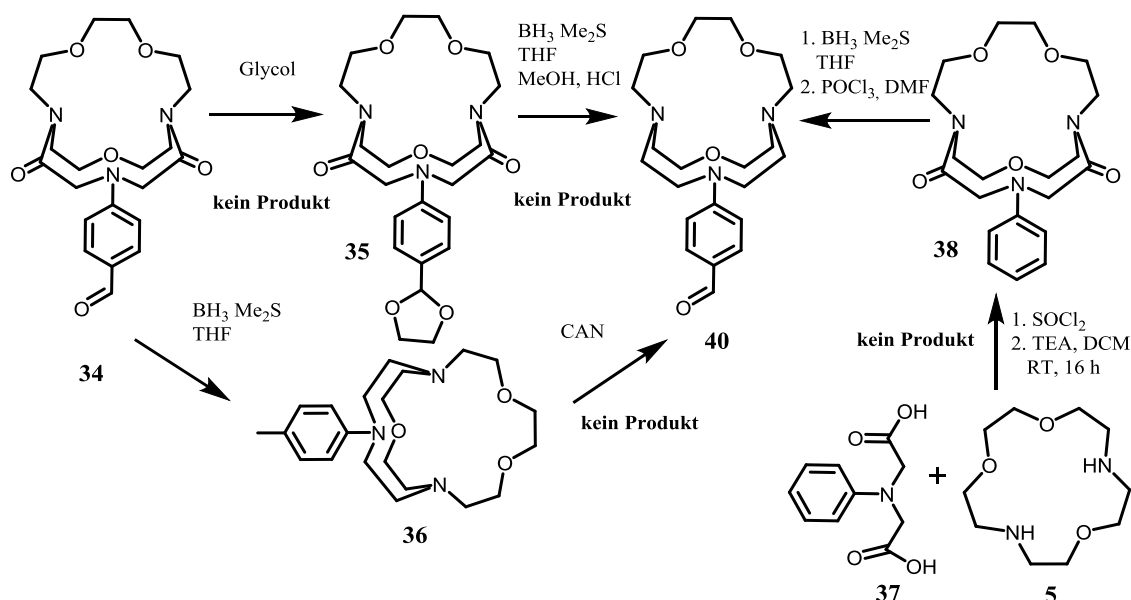


Abb. 61: Verschiedene Versuche, um Kryptandderivat **40 herzustellen.**

Die Synthese des Acetals **35** aus dem Kryptandderivat **34** funktionierte nicht. Bei der Hydrierung von **34** mit Boran entstand **36**, welches nicht zum Derivat **40** umgesetzt werden konnte. Die Kryptandsynthese aus **37** und **5** führte nicht zum Derivat **38**.

Da eine Herstellung von **40** über einen veränderten Syntheseweg und über Schutzgruppen nicht gelang, bestand die einzige Möglichkeit in einer selektiven Hydrierung, die die Amidgruppen reduziert und die Aldehydgruppe nicht umsetzt. Boranderivate scheinen ungeeignet, da sie die Aldehydgruppe komplett reduzieren, ebenso wie Hydrierungsreagenzien, die Lithium oder Natriumionen enthalten. Aluminiumverbindungen wie AlH_3 können Ester und Aldehyde zu Alkoholen reduzieren.⁵⁷ Ein Nachteil ist, dass AlH_3 nicht erhältlich ist und hergestellt werden müsste. Es gibt aber noch andere Aluminiumhydride, wie z.B. Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL), welches in Lösung kommerziell verfügbar ist. DIBAL spaltet bei $-60\text{ }^\circ\text{C}$ Ester und reduziert die Carboxygruppe zum Aldehyd. Bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ ist DIBAL in der Lage Ester und Amide zu den entsprechenden Alkoholen oder Aminen umzusetzen.⁵⁸ Kryptandderivat **34** wurde mit DIBAL in trockenem DCM umgesetzt, es entstand allerdings nicht **40** sondern **39**, d.h. die Aldehyd- wurde zur Hydroxygruppe reduziert (Abb. 62). Es wurden eine relativ kurze Reaktionszeit und ein geringer Überschuss an DIBAL gewählt, da sonst die Aldehydgruppe zu weit reduziert wird und das Methylderivat entsteht. Bei zu kurzer Reaktionszeit wurde ein unvollständiger Umsatz erhalten. Es gibt verschiedene Reaktionen, um die Hydroxygruppe von **39** zu oxidieren. Die *Dess-Martin-Oxidation* sticht besonders heraus, da sie meist eine sehr selektive Oxidation mit hoher Ausbeute erlaubt. Ein

Nachteil ist der relativ hohe Preis des benötigten *Dess-Martin-Periodans* (DMP). Nach der Vorschrift von Dess und Martin wurde nun **39** mit DMP 1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1*H*)-on umgesetzt und es entstand **40** (Abb. 62) und, als Nebenprodukt, der Essigsäureester von **39**.⁵⁹ Diese Nebenreaktion konnte durch Zugabe von Pyridin unterbunden werden.

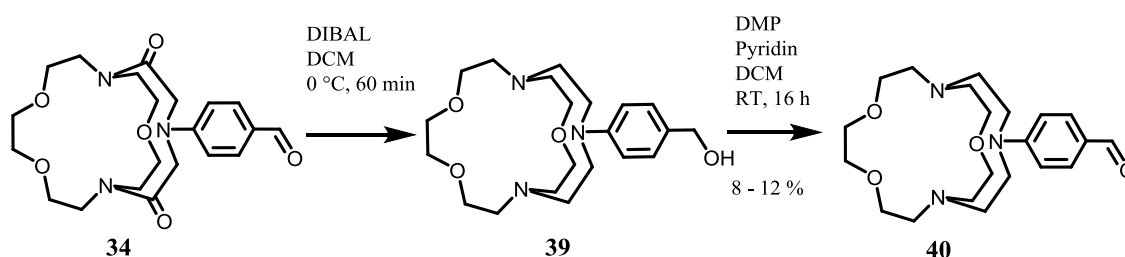


Abb. 62: Synthese von Kryptandderivat **40** aus **34** durch Hydrierung mit DIBAL und anschließender Oxidation mit *Dess-Martin-Periodan*.

Das Rohprodukt von **39** wurde durch Extraktion gereinigt und mit DMP oxidiert. Das erhaltene Produkt wurde, zuerst durch Extraktion, gereinigt und die Änderung per DC und MS verfolgt. Vor der Extraktion waren neben dem Produkt **40** meist noch Ausgangsstoff **34** und andere Nebenprodukte zu finden. Nach der Extraktion war fast nur der Molekülpeak von **40** vorhanden. Eine größere Menge von **40** wurde synthetisiert, einer ersten Reinigung durch Extraktion unterzogen und per MS überprüft. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes von **40** mit Aluminiumoxid schlug fehl. Im zweiten Versuch erfolgte die säulenchromatographische Reinigung mit Kieselgel und war erfolgreich. Das über Extraktion gereinigte Rohprodukt von **40** wurde über Kieselgel 60 mit DCM/MeOH/Essigsäure gereinigt, dabei wurde eine Ausbeute von 8 - 12 % bezogen auf **34** bzw. eine Ausbeute von 15 - 20 % bezogen auf das Rohprodukt von **39** erzielt. Das [2.1.1]-Derivat **40** ist ein bräunliches, stark hygroskopisches Harz. Neben MS- konnten HR-MS- und NMR-Spektren erhalten werden. Aus dem [2.1.1]-Derivat **40** konnten verschiedene [2.1.1]-Farbstoff-Strukturen synthetisiert werden. Für die Farbstoffsynthesen wurde meist das durch Extraktion gereinigte Rohprodukt von **40** verwendet.

3.3.3.3 Synthese von [2.1.1]-Fluoreszenzfarbstoff-Strukturen

Um eine [2.1.1]-Xanthenfarbstoff-Struktur zu gewinnen, wurde **40** mit 4-Chlorresorcinol umgesetzt, aber es konnte kein Produkt identifiziert werden.³⁸ In

parallel durchgeführten Versuchen mit dem Diaza-[15]Krone-5-Ionophor **7** (siehe Kapitel 3.1.4) konnte gezeigt werden, dass die meisten Synthesevorschriften für die Xanthenfarbstoffe nicht auf das Ionophor **7** anwendbar waren. Das Diaza-[15]Krone-5-Ionophor **7** konnte nach einigen Versuchen mit Resorcinol zum entsprechenden Xanthenderivat umgesetzt werden. Dies wurde auf **40** übertragen und mit Resorcinol in MeSO₃H bei 74 °C konnte Kryptandderivat **42** gewonnen werden (Abb. 63).

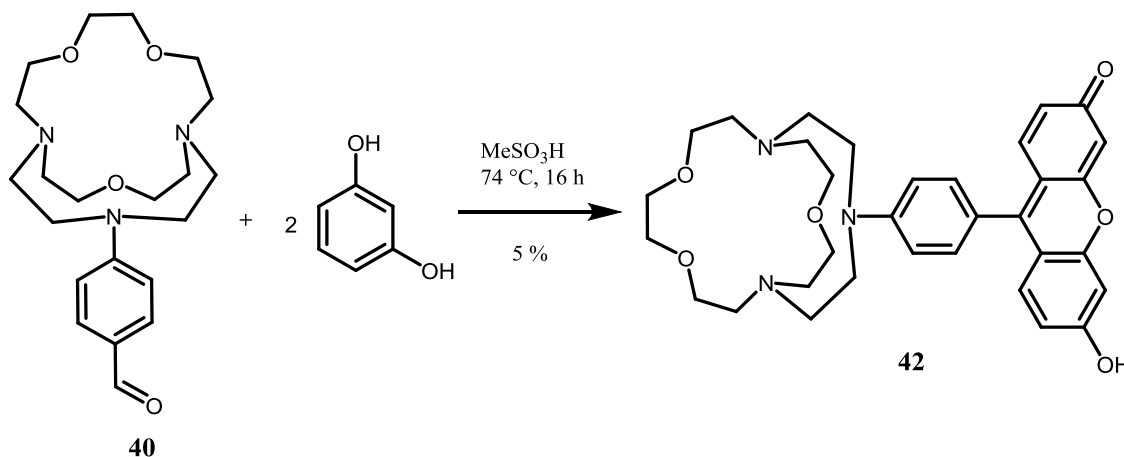


Abb. 63: Synthese des [2.1.1]-Xanthenderivates **42** aus **40** und Resorcinol.

Im ersten Reaktionsschritt fanden die elektrophile Substitution und die Cyclisierung statt. Im zweiten Schritt erfolgte die Oxidation durch Luftsauerstoff, d.h. es war keine separate Oxidation mit Chloranil o.ä. Reagenzien notwendig. Nach der wässrigen Aufarbeitung wurde im Rohprodukt **42** mittels MS nachgewiesen. Die anschließende Reinigung gestaltete sich sehr schwierig. Erste Versuche der Reinigung mittels präparativer DC und Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 schlugen fehl. Erst wiederholte Versuche der Ausreinigung mit RP-18 Kieselgel brachten eine relativ saubere Menge von **42** hervor. Es zeigte sich, dass trotz der starken Fluoreszenz des Rohproduktes nur eine geringe Menge an Produkt **42** entstand. Es konnten von **42** ¹H-NMR-, MS-, HR-MS-, UV-Vis- und Fluoreszenzspektren ermittelt und somit die Struktur hinreichend charakterisiert werden. Die Untersuchung von **42** zeigte, dass das Ionophor gesättigt war und bei Zugabe von Natrium keine Änderung der Fluoreszenz zeigte (siehe Kapitel 3.4.1). Versuche, die Ionen durch Ionentauscher zu entfernen, scheiterten, da **42** nicht vom Ionentauschharz getrennt werden konnte. Nur mit [2.2.1] (KRYPTOFIX® 221, MERCK) war eine Entfernung der gebundenen Ionen möglich.

Um [2.1.1]-Styrylfarbstoff-Strukturen zu gewinnen, wurde **40** mit CH-aziden Verbindungen umgesetzt. Aus **40** und 1,4-Dimethylpyridiniumiodid wurde **43** hergestellt (Abb. 64).

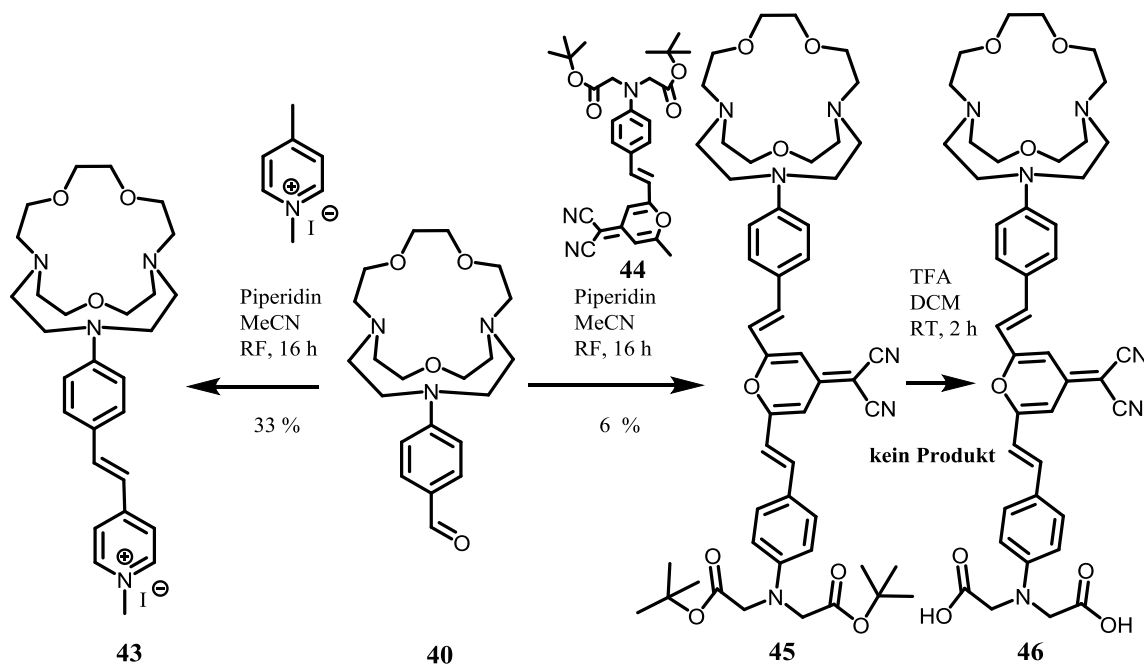


Abb. 64: Reaktion von **40** mit CH-aziden Verbindungen zu den [2.1.1]-Derivaten **43** und **45**.

Das gut wasserlösliche Harz wurde über Aluminiumoxid chromatographisch gereinigt und es konnten NMR- und MS-Spektren gemessen werden. Derivat **43** zeigte keine Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Natriumionenkonzentration (siehe Kapitel 3.4.2). Aus N,N-Diessigsäure-*tert*-butylester-4-aminobenzaldehyd **31** und 2-(2,6-dimethyl-4H-pyran-4-yliden)-malononitril wurde **44** hergestellt und mit **40** zum Kryptandderivat **45** umgesetzt. Es konnten nur kleine Mengen erhalten werden und die Reinigung blieb unvollständig. Derivat **45** zeigte ebenfalls wie **43** keine Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Natriumionenkonzentration (siehe Kapitel 3.4.2). Eine Spaltung des *tert*-Butylesters gelang nicht (Abb. 64).

Um ein entsprechendes [2.1.1]-Rhodaminderivat zu erhalten, wurde **40** mit **24** umgesetzt.¹⁰ Im ersten Schritt soll die elektrophile Substitution und die Cyclisierung bzw. Dehydratisierung stattfinden und im zweiten Schritt die Oxidation des Leuko-Farbstoffes zum Rhodamin. Das erhaltene Zwischenprodukt, das laut Gee und Martin Leuko-Farbstoff **CR2** sein sollte, konnte nicht mit Chloranil oxidiert werden (Abb. 65).¹⁰

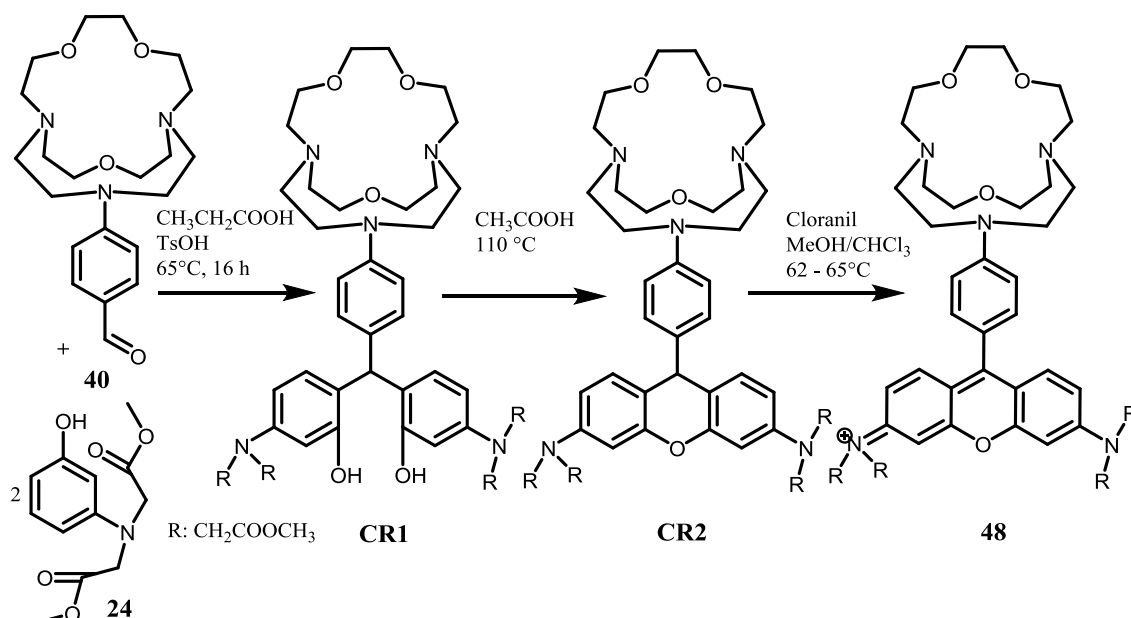


Abb. 65: Synthese des Kryptandrhomaminderivates **48** aus **24** und **40**.

Es wurden daher eine Vielzahl von Oxidationsmitteln getestet, neben Cerammoniumnitrat (CAN), PbO_2 , SiO_2/O_2 und 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) auch (Bis(trifluoracetoxi)iod)benzol. Lediglich auf DC-Platten zeigte der Farbstoff, nach längerer Oxidation an der Luft, eine rote Fluoreszenz. Bei genauerer Untersuchung (MS) zeigte sich, dass nicht **CR2** sondern **CR1** entstand, welches nicht von den Oxidationsmitteln zu **48** umgesetzt werden konnte. Es musste erst noch eine Cyclisierungsreaktion in Eisessig folgen, um **CR2** zu erhalten. Die anschließende Oxidation mit Chloranil gelang. Versuche, durch Variation der Reaktionsbedingungen **CR2** direkt herzustellen, zeigten keinen Erfolg. Es konnte nur sehr wenig **48** gewonnen werden. Die Aufreinigung gestaltete sich schwierig und blieb, trotz Säulenchromatographie mit Kieselgel und RP18-Kieselgel, unvollständig. Das Rohprodukt zeigte keine Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz (siehe Kapitel 3.4.2).

3.3.3.4 Synthese von [2.1.1]-Farbstoff-Strukturen aus **34** mit anschließender Hydrierung

Das [2.1.1]-Derivat **34** wurde mit 1,4-Dimethylpyridiniumiodid zu Derivat **49** umgesetzt (Abb. 66). Produkt **49** war sehr polar. Die Reinigung von Derivat **49** blieb unvollständig und es zeigte keine Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Natriumionenkonzentration (siehe Kapitel 3.4.2). Die Hydrierung des Kryptand-Styryl-farbstoffderivates **49** mit Boran funktionierte nicht.

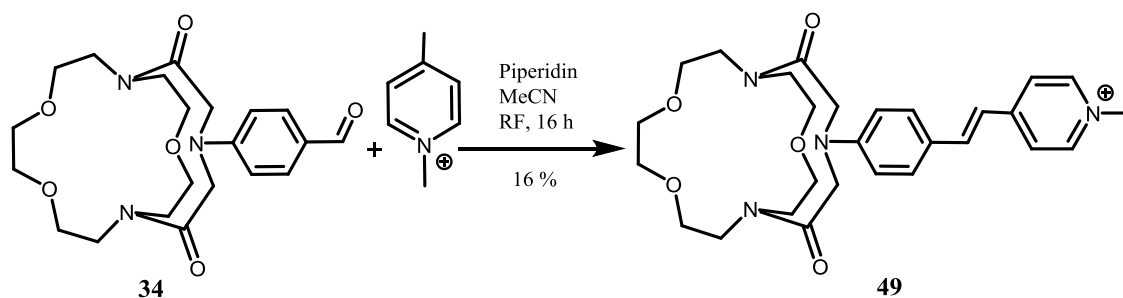


Abb. 66: Synthese des Kryptand-Styrylfarbstoffderivates **49** aus dem [2.1.1]-Derivat **34**.

Derivat **34** wurde mit Resorcinol umgesetzt um **50** zu erhalten. Die Ausbeute war gering und eine Reinigung über präparative DC gelang nicht. Das Rohprodukt wurde versuchsweise mit Boran und DIBAL hydriert. Derivat **42** konnte nicht identifiziert werden (Abb. 67).

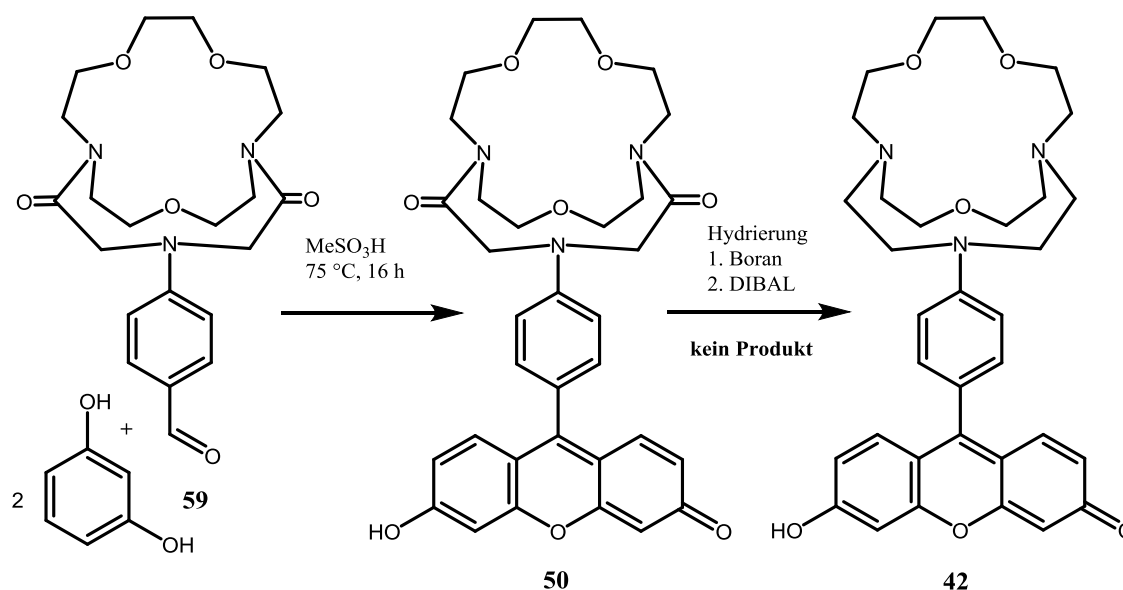


Abb. 67: Reaktion von [2.1.1]-Derivat **34** mit Resorcinol zu **50**, mit anschließender Hydrierung.

Um ein Rhodamin-Derivat zu gewinnen, wurde **34** mit 3-Diethylaminophenol umgesetzt.⁴² Es konnte kein Produkt identifiziert oder isoliert werden (Abb. 68). Aus 3-Aminophenol und Bromessigsäuremethylester wurde **55** hergestellt und in einem Vorversuch mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd umgesetzt. Da das Produkt identifiziert werden konnte, wurde **34** mit **55** nach der gleichen Prozedur umgesetzt.¹⁰ Es konnte kein Produkt **52** isoliert oder identifiziert werden (Abb. 68).

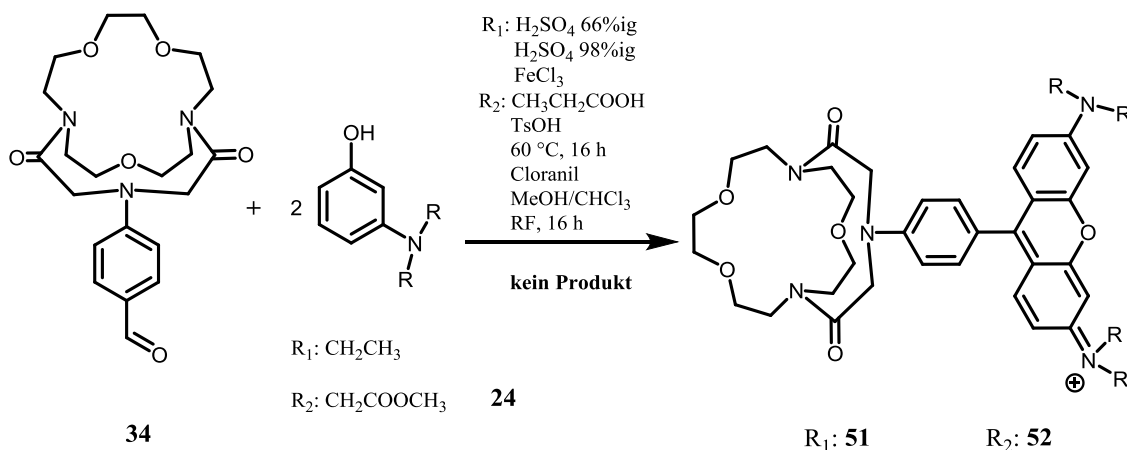


Abb. 68: Reaktionen von **34** mit 3-Aminophenolderivaten.

3.3.4 Kryptandstrategie II - Synthese von N-geschützten Kryptandderivaten

Es wurde zuerst untersucht, welche Synthesemethode geeignet ist, um N-geschützte Kryptandderivate herzustellen. N-Tosyliminodiessigsäure **71** wurde chloriert **72** und mit Diaza-[15]Krone-5 **5** in einer Hochverdünnungsreaktion umgesetzt (Abb. 69). Die Kryptandsynthese erfolgte über drei verschiedene SyntheseprozEDUREN. In der ersten Reaktion **A** wurden beide Ausgangsstoffe zusammen in Toluol gelöst und langsam in ein großes Volumen an Toluol mit TEA getropft. In der zweiten Reaktion **B** wurden beide Ausgangsstoffe getrennt in Toluol gelöst und langsam und simultan in ein großes Volumen an Toluol getropft, wobei beim Diaza-Kronenether das TEA enthalten war.³² In der dritten Reaktion **C** wurden die Ausgangsstoffe und TEA in einem großen Volumen DCM gelöst und gerührt.⁵³ Alle drei Reaktionen fanden bei Raumtemperatur statt.

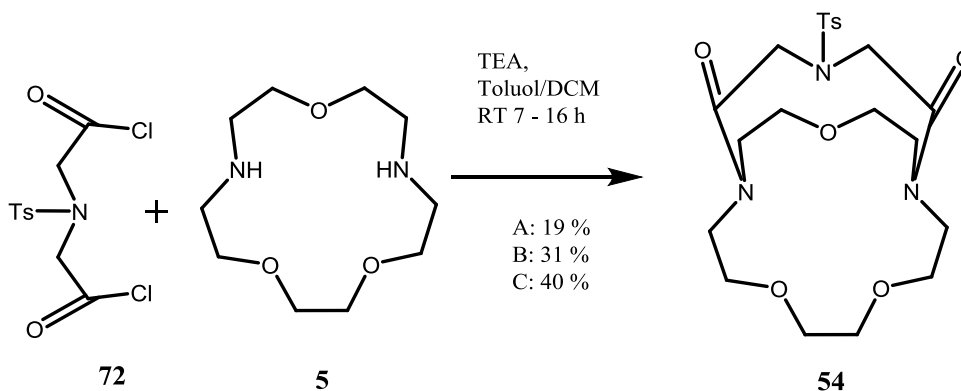


Abb. 69: Synthese von **54** aus N-Tosyliminodiessigsäurechlorid **72** und Diaza-[15]Krone-5 **5** bei verschiedenen Reaktionsbedingungen.

Nach Aufarbeitung und Säulenchromatographie zeigte sich, dass die Synthesemethode **C** nach Wanichacheva et al. nicht nur mit 40 % die höchste Ausbeute zeigte, sondern auch die einfachste Synthesedurchführung bot.⁵³ Synthesemethode **C** wurde deswegen zur quantitativen Synthese von **54** verfolgt. Kryptandderivat **54** wurde schließlich, wie von Graf und Lehn beschrieben, mit LiAlH_4 umgesetzt.⁶⁰ Es wurden zuerst die Amid- zu Aminogruppen reduziert. Anschließend wurde die Tosylgruppe abgespalten. Die Hydrierung mit LiAlH_4 lieferte jedoch den Lithiumkomplex des [2.1.1]-Derivates, der eine sehr hohe Komplexstabilitätskonstante aufwies.

Da die Lithiumionen nicht aus dem Komplex entfernt werden konnten, wurden eine ionenfreie Hydrierung und Entschützung vorgenommen. Hierzu wurde Derivat **54** mit Boran hydriert.^{50, 61} Die Abspaltung der Tosylgruppe mit anderen Reagenzien wie Schwefelsäure gelang schlecht und es konnten nur Spuren des Produktes **55** erhalten werden (Abb. 70).⁶²

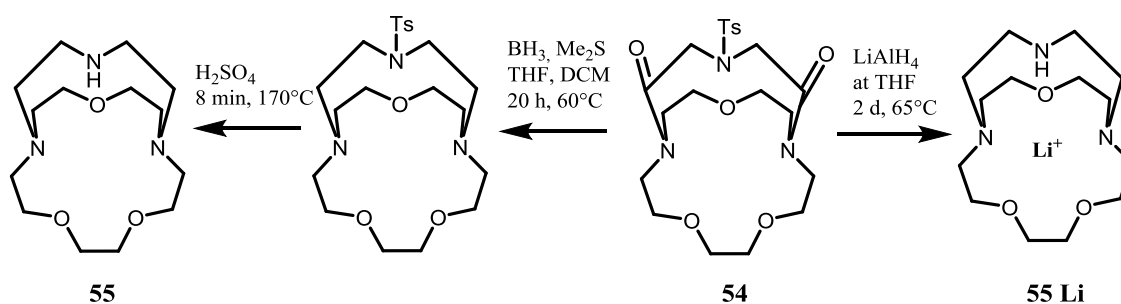


Abb. 70: Hydrierung und detosylierung von Kryptandderivat **54**.

Neben der Tosyl- gibt es noch eine Vielzahl von weiteren Schutzgruppen für Imine. Von Wanichacheva et al. wurde die Fmoc Schutzgruppe verwendet.⁵³ Sie ist säurestabil, kann aber von Piperidin oder ähnlichen Basen gespalten werden. Iminodiessigsäure wurde mit Fmoc geschützt **57** und zum Säurechlorid umgesetzt. Die anschließende Reaktion des Säurechlorids mit **5**, nach Vorschrift **C**, brachte, trotz mehrfacher Versuche und Variation der Reaktionsbedingungen, kein Produkt hervor (Abb. 71). Auch die Verwendung einer Boc Schutzgruppen führte nicht zu einem entsprechenden Kryptandderivat.

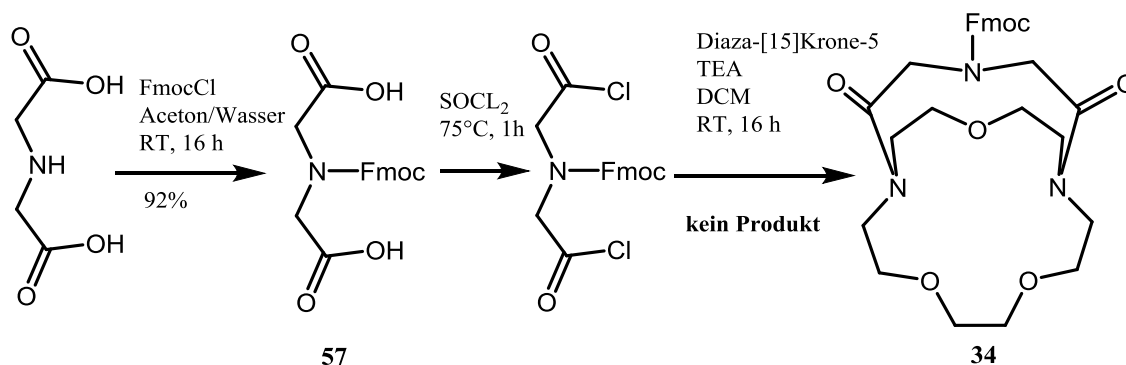


Abb. 71: Reaktion der Fmoc-geschützten Iminodiessigsäure **57** mit Diaza-[15]Krone-5 **5**.

3.3.5 Kryptandstrategie III - Synthese von [2.1.1]-basierenden Natrium- ionenindikatoren aus Farbstoffen mit Iminodiessigsäuregruppe

Styrylfarbstoffe lassen sich sehr leicht durch *Knoevenagel-Kondensation* herstellen. Sie sind gut geeignet, um Iminodiessigsäure-Farbstoff-Derivate zu gewinnen und sie mit Diaza-[15]Krone-5 **5** zu entsprechenden Kryptandderivaten, umzusetzen. Produkt **31** ließ sich leicht mit CH-aziden Verbindungen wie 1,4-Dimethylpyridiniumiodid und 2-(2,6-dimethyl-4H-pyran-4-yliden)-malononitril umsetzen. Nach der Esterspaltung wurden die erhaltenen Derivate **62** und **63** mit Diaza-[15]Krone-5 **5** umgesetzt.⁵³ Trotz wiederholter Versuche konnte nur Kryptandderivat **64** gewonnen werden (Abb. 72). Die Reinigung von **64** blieb unvollständig.

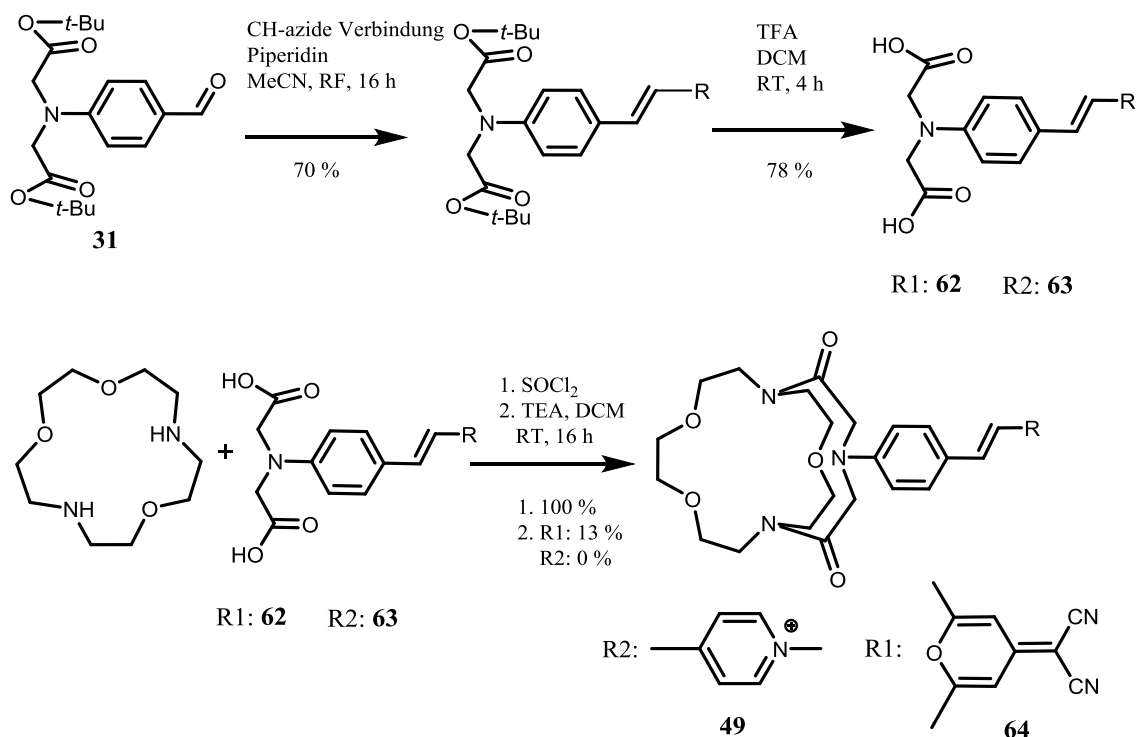


Abb. 72: Synthese von Iminodiessigsäure-Styrylfarbstoff-Derivaten aus **31 und CH-aziden Verbindungen.**

Der *tert*-Butylester wurde anschließend mit TFA gespalten, das Säurechlorid gebildet und mit Diaza-[15]Krone-5 **5** zu entsprechenden [2.1.1]-Styrylfarbstoff-Derivaten umgesetzt.

3.3.6 Diskussion

Um zu [2.1.1]-Fluoreszenzfarbstoff-Strukturen zu gelangen, wurden drei Synthesestrategien verfolgt. Das Ziel der ersten Strategie war die Synthese eines [2.1.1]-Derivates mit funktioneller Gruppe, um an dieser nach der Kryptandsynthese, den Farbstoff aufbauen zu können. Die Reaktion von Diaza-[15]Krone-5 **5** mit N,N-Diessigsäure-4-aminobenzaldehyd **32** führte zum [2.1.1]-Derivat **34**. Verbindung **34** konnte in relativ guten Ausbeuten rein erhalten werden. Es gelang, sie auszukristallisieren und eine Röntgenkristallstruktur zu bestimmen. Derivat **34** konnte nicht mit Boran hydriert werden, da Boran die Aldehyd- bis zur Methylgruppe hydrierte. Diese konnte nicht in eine Aldehydgruppe umgewandelt werden. Das Schützen der Aldehydgruppe über ein Acetal gelang ebenfalls nicht, da der Aromat nicht elektronenarm genug war, um ihn effektiv zu einem Acetal umzusetzen. N-Phenyl-iminodiessigsäure **37** ließ sich nicht zu einem entsprechenden Kryptandderivat umsetzen, somit konnte Ionophor **40** auch nicht über einen veränderten Syntheseweg hergestellt werden. Die Synthese von Ionophor **40** gelang durch eine selektive Hydrierung von [2.1.1]-Derivat **34** mit DIBAL und einer anschließender Oxidation des

Zwischenproduktes mit *DMP*. Das [2.1.1]-Derivat **40** ließ sich zum Xanthenderivat **42**, zu den Styrylderivaten **43** und **45** und zu dem Rhodaminderivat **48** umsetzen. Alle vier Verbindungen zeigten bei Natriumzugabe keine Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz, was auf einen geringen K_d -Wert und damit auf ein bereits gesättigtes Ionophor zurückzuführen war (vgl. Abschnitt 1.4.5). Das [2.1.1]-Xanthen-Derivat **42** wurde genauer untersucht (siehe Abschnitt 3.4.1), da vergleichbare Ionophor-7-Xanthenderivate wie **13** und **17** eine starke Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz zeigten (siehe Abschnitt 3.2.6 und 3.2.1). Mit [2.2.1] gelang bei Derivat **42** die Entfernung der gebunden Ionen und eine Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz wurde nachgewiesen (siehe Kapitel 3.4.1). Zwar konnte [2.1.1]-Derivat **34** zum [2.1.1]-Styrylfarbstoff-Derivat **49** und zum [2.1.1]-Xanthenfarbstoff-Derivat **50** umgesetzt werden, allerdings blieb die Reinigung und Hydrierung beider Derivate unvollständig.

In der zweiten Synthesestrategie wurde Diaza-[15]Krone-5 **5** mit N-Tosyl-Iminodiessigsäure **71** umgesetzt. Es entstand die N-Tosyl-geschützte Kryptandstruktur **54** in guten Ausbeuten. Die Hydrierung gelang, aber die Detosylierung blieb unvollständig. Die Verwendung leichter abspaltbarer Schutzgruppen wie Fmoc und Boc führte zu keinem Kryptandderivat.

In der dritten Synthesestrategie wurde Diaza-[15]Krone-5 **5** mit Iminodiessigsäure-Farbstoff-Derivaten umgesetzt. Die Synthese der entsprechenden Iminodiessigsäure-Farbstoffderivate **62** und **63** gelang. Nur das Styrylfarbstoff-Derivate **62** konnte zum entsprechenden [2.1.1]-Styrylfarbstoff-Derivat **64** umgesetzt werden. Die Reinigung von **64** blieb unvollständig.

Die Synthese von Kryptandstrukturen funktionierte nur bei bestimmten Iminodiessigsäurederivaten wie 4-Formylphenylaminodiessigsäure **32**, N-Tosyl-Iminodiessigsäure **71** und dem Iminodiessigsäure-Farbstoffderivat **62**. Sie waren unpolar und gut in DCM löslich. N-Phenyl-Iminodiessigsäure **37**, N-Fmoc-Iminodiessigsäure **57** und das Iminodiessigsäure-Farbstoffderivat **63** ließen sich nicht zu entsprechenden Kryptandderivaten umsetzen.

3.4 Spektroskopische Untersuchung der [2.1.1]-Farbstoffstrukturen

Die verschiedenen synthetisierten neuen Kryptand-Farbstoffstrukturen (Abb. 73), wurden auf ihre spektroskopischen Eigenschaften untersucht. Von allen Kryptand-Farbstoff-Derivaten wurden UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren gemessen und daraus das Absorptions- und Emissionsmaximum ermittelt. In einem Vorversuch wurde geprüft, ob sich die Fluoreszenz bei Erhöhung der Natriumionenkonzentration ändert. Es wurde ein Überschuss NaCl zu den Verbindungen gegeben und vor und nach der Zugabe die Fluoreszenz vermessen.

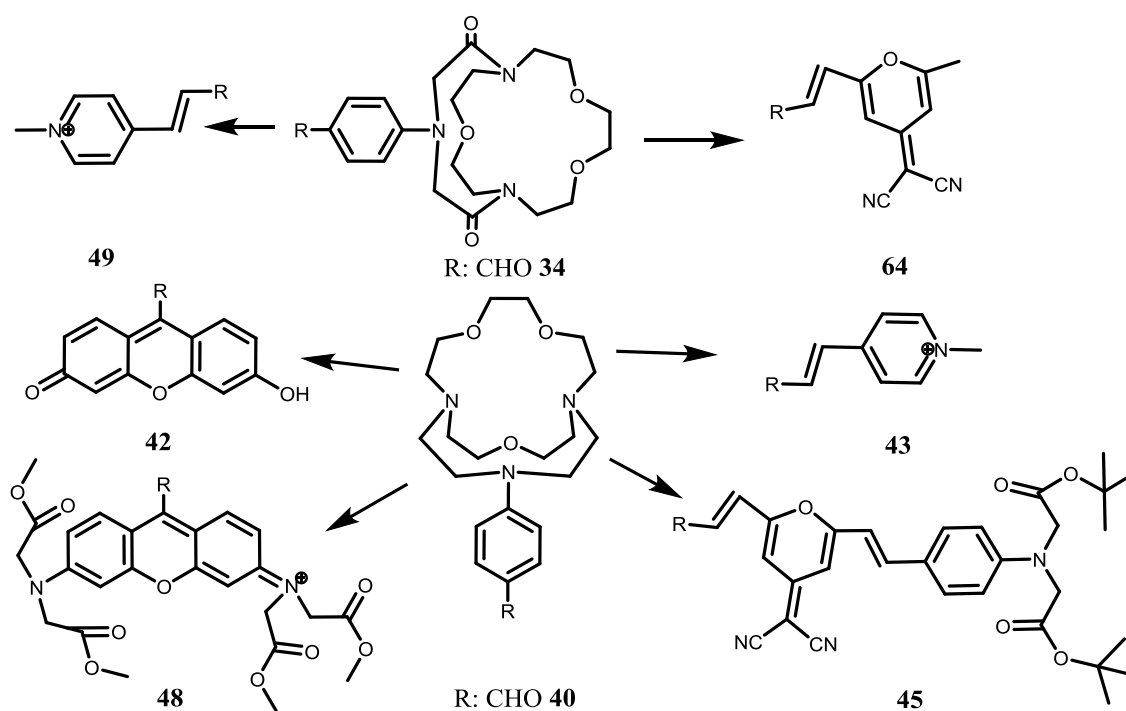


Abb. 73: Untersuchte Kryptand-basierenden Farbstoffstrukturen.

Keine Struktur zeigte eine Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz. Da Ionophor-7-Xanthenderivate, wie **13** und **17**, eine hohe Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz aufwiesen, wurde das vergleichbare Kryptandderivat **42** genauer untersucht. Da die Kryptanden eine sehr hohe Komplexstabilitätskonstante besitzen, was einer geringen Dissoziationskonstante entspricht, wurde versucht, die Natriumionen zu entfernen.²⁰ Mit einem Überschuss an [2.2.1] konnte gebundenes Natrium aus dem Kryptandderivat **42** entfernt werden. Somit konnte zumindest qualitativ die Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz bestätigt werden. Eine Bestimmung des K_d -Wertes war nicht möglich. Die

relative Quantenausbeute von Verbindung **42** (Φ) wurde, wie bei den Ionophor-7-Farbstoff-Derivaten beschrieben, gegen einen Standard mit bekannter Quantenausbeute Φ_s , ermittelt.^{43, 44}

3.4.1 Untersuchung der [2.1.1]-Farbstoffstruktur **42**

3.4.1.1 Messung der UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs-, Fluoreszenzemissionsspektren und der Quantenausbeute von **42**

Das UV-Vis-Spektrum wies ein Absorptionsmaximum bei 493 nm auf, mit $\epsilon = 39809 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Das Emissionsmaximum lag bei 519 nm (Abb. 74). Für Derivat **42** wurde eine relative Quantenausbeute von 0,137 (13,7 %) für **42** in Abwesenheit von Na^+ berechnet.

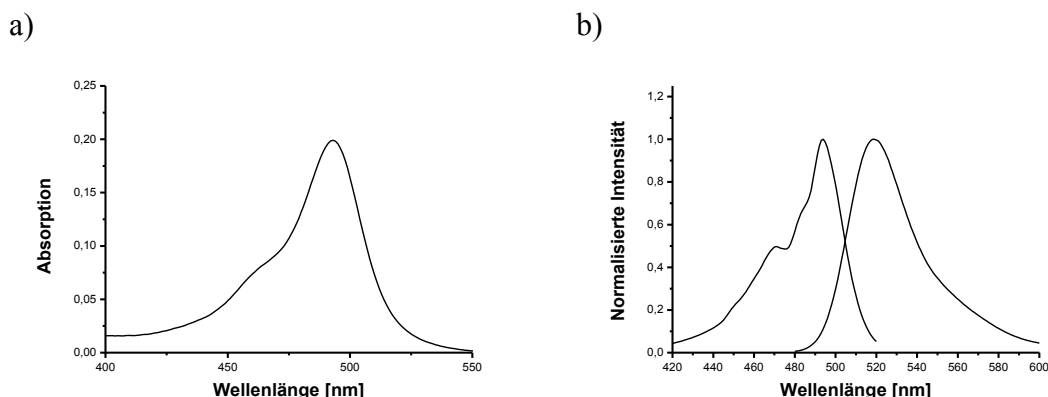


Abb. 74: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von **42.**

Die Spektren von **42** wurden in einer 10 mM Hepes Lösung bei pH = 7,4 gemessen. a) Das UV-Vis-Spektrum wies ein Maximum bei 493 nm auf. b) Das normierte Fluoreszenzanregungsspektrum (linke Kurve) wies ein Maximum bei 494 nm auf, die Fluoreszenz wurde bei 530 nm gemessen. Zur Messung des Fluoreszenzemissionsspektrums (rechte Kurven) wurde bei 470 nm angeregt. Das Emissionsspektrum wurde auf 1 normiert und zeigte ein Maximum bei 519 nm. Es ergab sich eine Stokes-Verschiebung von $\Delta\lambda = 25 \text{ nm}$.

3.4.1.2 Messung der Fluoreszenzänderung von **42** in Gegenwart von [2.2.1]

In einer Küvette wurde die Fluoreszenzänderung von **42** (5 μM) in Gegenwart von 20 μl (34 mM), 40 μl (68 mM) und 60 μl (102 mM) [2.2.1] verfolgt. Die Fluoreszenz sank, bei Zugabe von [2.2.1], auf 1/20 der ursprünglichen Fluoreszenz. Derivat **42** zeigte eine starke Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz, wies aber eine so geringe Dissoziationskonstante auf, dass die Indikatorstruktur nach der Synthese und Reinigung bereits gesättigt war.

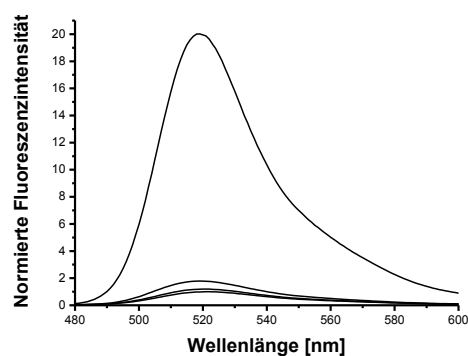


Abb. 75: Fluoreszenzänderung von 42 in Gegenwart von [2.2.1].

Fluoreszenzspektren von 42 (5 µM) in Gegenwart von 102 (untere Kurve), 68, 34 und 0 mM [2.2.1] (obere Kurve). Alle Lösungen wurden mit 10 mM Hepes gepuffert und auf pH = 7,4 eingestellt. Die maximale Fluoreszenz bei 102 mM [2.2.1] wurde auf 1 normiert und alle anderen Fluoreszenzspektren auf diesen Wert skaliert.

3.4.2 Untersuchung der [2.1.1]-Farbstoffstrukturen 64, 49, 48, 45 und 43

Die Absorptions- und Emissionsmaxima der [2.1.1]-Farbstoffstrukturen 64, 49, 48, 45 und 43 wurden in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Absorptions- und Emissionsmaxima der [2.1.1]-Farbstoffstrukturen 64, 49, 48, 45 und 43.

[2.1.1]-Farbstoffstruktur	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
64	352, 420 – 430 ^a	594
49	444	674
48	522	553
45	438	570
43	341, 421 ^b	570

(a) Das Absorptionsspektrum von 64 wies eine Schulter auf. (b) Das Absorptionsspektrum von 43 wies ein 2. Maximum auf.

3.4.3 Diskussion

Es wurden verschiedene Strukturen, die auf dem [2.1.1]-Kryptand in seiner Amidform **34** oder in seiner hydrierten Form **40** basieren, untersucht (Abb. 73). Alle Strukturen zeigten bei Zugabe von Na^+ keine Änderung der Fluoreszenz. Die Kryptand-Xanthen-Struktur **42** wurde genauer untersucht. Da vergleichbare Ionophor-7-Xanthenderivate wie **13** und **17** eine starke Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz zeigten (siehe Abschnitt 3.2.6 und 3.2.1), wurde angenommen, dass das Ionophor des [2.1.1]-Xanthen-Derivates **42** bereits gesättigt war. Mit [2.2.1] konnten die gebundenen Ionen zum Großteil aus der Struktur **42** entfernt werden und es ergab sich eine Verringerung der Fluoreszenzintensität um das 20fache. Die Dissoziationskonstante konnte nicht bestimmt werden, weil das Ionophor von **42** nach Synthese und Reinigung bereits gesättigt war. In der Synthese und Reinigung wurde, soweit wie möglich, natriumfrei gearbeitet. Dass das Ionophor trotz dessen mit Natriumionen gesättigt war, deutet auf einen sehr niedrigen K_d -Wert hin. Laut Izatt und Bradshaw weist [2.1.1] einen $\lg K_s$ von 4,4 bis 8,9, je nach Messmethode und Lösungsmittel, auf.²⁰ Diese Werte für [2.1.1] entsprechen K_d -Werten von 40 μM bis 1 nM. Es waren keine in Wasser gemessene $\lg K_s$ - oder K_d -Werte von [2.1.1] verfügbar. Da in Wasser die Komplexstabilität sinkt (siehe Kap. 1.4.2 und 1.4.5) und damit die Dissoziationskonstante steigt, sollte der K_d -Wert von **42** größer sein als die in organischen Lösungsmitteln bestimmten K_d -Werte von [2.1.1]. Mit 13,7 % wies **42** die größte Quantenausbeute aller untersuchten Verbindungen auf.

3.5 Synthese von [16]Krone-5-basierenden Natriumindikatoren

3.5.1 Synthesestrategien bei [16]Krone-5 basierenden Natriumindikatoren

Um die von Suzuki et al. vorgestellten hochnatriumselektiven Ionophore für Natriumindikatoren nutzbar zu machen, müssen sie modifiziert werden. Indem ein Sauerstoffatom durch ein Stickstoffatom substituiert wird, kann am Imin der Farbstoff gebunden werden. Verschiedene Synthesestrategien sind denkbar. Eine Möglichkeit wäre der modulare Aufbau der [16]Krone-5-Farbstoff-Struktur. Ionophor und Fluorophor werden getrennt voneinander synthetisiert und erst am Ende verbunden. Das würde eine hohe Flexibilität mit sich bringen und man könnte weitere Fluorophore einbringen, die die Komplexstabilität erhöhen, indem sie Donorgruppen in *ortho*-Position bereitstellen (Abb. 76).

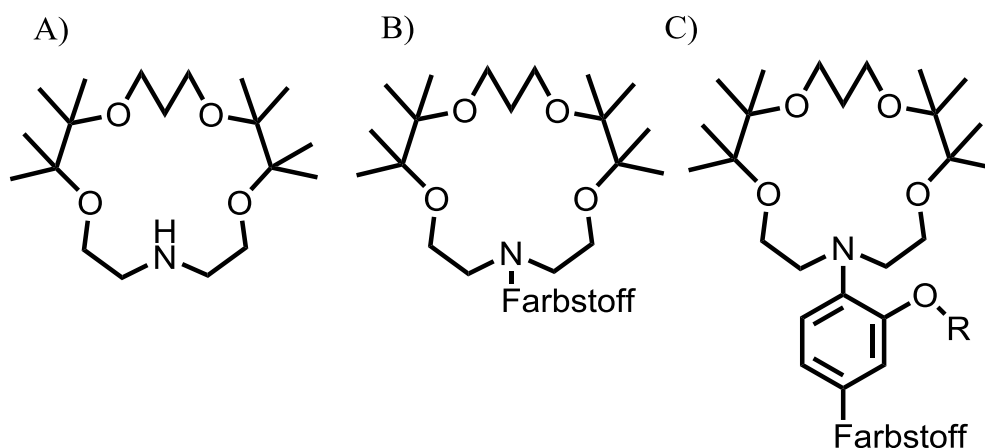


Abb. 76: Zielstrukturen der [16]Krone-5 basierenden Natriumindikatoren:

A) [16]Krone-5 Ionophor mit freier Iminogruppe, B) Ionophor mit Farbstoff und C) Ionophor mit Farbstoff und weiterer Donorgruppe in *ortho*-Position.

Die meisten Kronenether werden über eine *Williamson-Ethersynthese* aus einem Nukleophil und einem Elektrophil mit je zwei funktionellen Gruppen hergestellt. Auf Grund des bifunktionellen Charakters von Nukleophil und Elektrophil gibt es viele Nebenreaktionen, in denen sich größere Cyclooligomere oder, anstatt des Ringschlusses, offenkettige Oligo- und Polymere bilden. Um diese Nebenreaktionen zu verhindern, wird mit hohen Verdünnungen und einem exakten stöchiometrischen Verhältnis gearbeitet. Es werden meist unpolare oder polare aprotische Lösungsmittel und mittelstarke bis starke Basen wie Pyridin und NaH verwendet. Oft kann die

Ausbeute durch ein passendes Templat erhöht werden. Neben der *Williamson-Ethersynthese* wird auch oft die Veresterung angewendet, um aus einem Diol und einer aktivierten Dicarbonsäure einen Kronenether herzustellen. Dabei wird meist eine deutlich höhere Ausbeute erzielt. Die Aktivierung der Dicarbonsäure erfolgt hauptsächlich über Chlorierung. Die entstehende Estergruppe muss zum Ether hydriert werden. Durch die zusätzliche Reaktion bei der Veresterung sind die Ausbeuten beider Reaktionswege meist vergleichbar.⁵⁰

3.5.2 Synthese von [16]Krone-5 basierenden Natriumindikatoren

Um das geplante Ionophor herzustellen, wurde dem Ansatz von Suzuki et al. folgend Pinacol und Malonaldehydbisdimethylacetal zum Bis(4,4,5,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-2-yl)methan **65** umgesetzt.²⁶ Mit AlCl_3 und LiAlH_4 wurde der Ring geöffnet, um 1,1,2,2,8,8,9,9-Octamethyl-3,7-dioxanonan-1,9-diol **66** zu erhalten (Abb. 77).

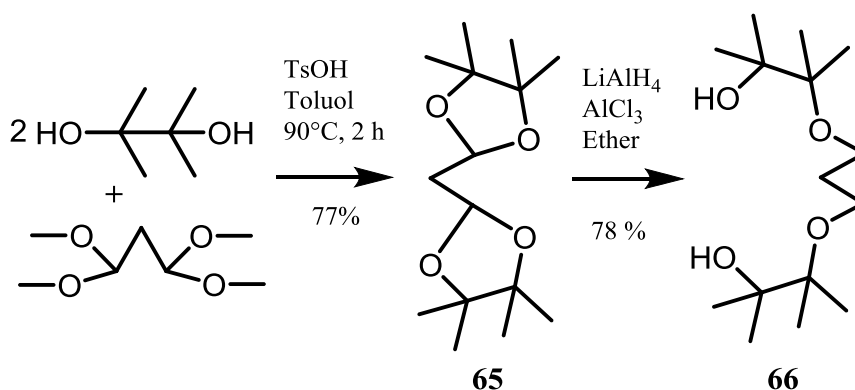


Abb. 77: Synthese von 1,1,2,2,8,8,9,9-Octamethyl-3,7-dioxanonan-1,9-diol **66** aus Pinacol und Malonaldehydbisdimethylacetal.²⁶

In einem zweiten Ansatz wurde Diethanolamin am Stickstoff geschützt. Die Hydroxygruppen wurden tosyliert, um sie in gute Abgangsgruppen umzuwandeln. Zum Schutz des Imins kommen verschiedene basenstabile Schutzgruppen in Frage. Beim Schutz der Iminogruppe mit einer Boc-Schutzgruppe entstand nach Tosylierung wider Erwarten das Produkt **68** (Abb. 78).⁶³ Aus diesem Grund musste mit einer anderen Schutzgruppe gearbeitet werden. Zu diesem Zweck wurde Diethanolamin mit einem Überschuss an Tosylchlorid umgesetzt, sodass die Iminogruppe durch eine Tosylschutzgruppe geschützt und die Hydroxygruppen in Tosylate überführt wurden (Abb. 78).⁶⁴

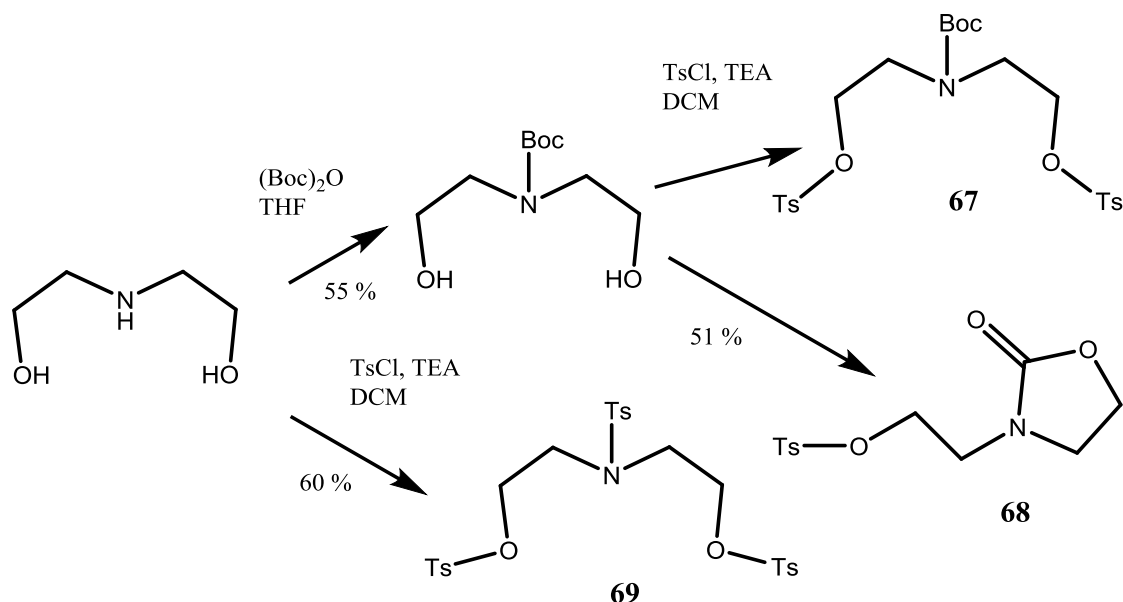


Abb. 78: Synthese von N,O,O'-Tri(tolyl-4-sulfonyl)diethanolamin **69** aus Diethanolamin⁶⁴ mit Reaktion des Boc geschützten Derivats zum Nebenprodukt **68**.

Das Elektrophil **69** und das Nukleophil **66** wurden bei hoher Temperatur und hoher Verdünnung im äquimolaren Verhältnis analog zur Synthese von Suzuki et al. gerührt.²⁶ Das erwartete Produkt **70** konnte jedoch nicht identifiziert oder isoliert werden. Auch eine Variation der Reaktionsbedingungen brachte keinen Erfolg, was im Einklang mit der geringen Ausbeute von 3,7 % steht, die Suzuki et al. in ihren Experimenten erzielten (Abb. 79).

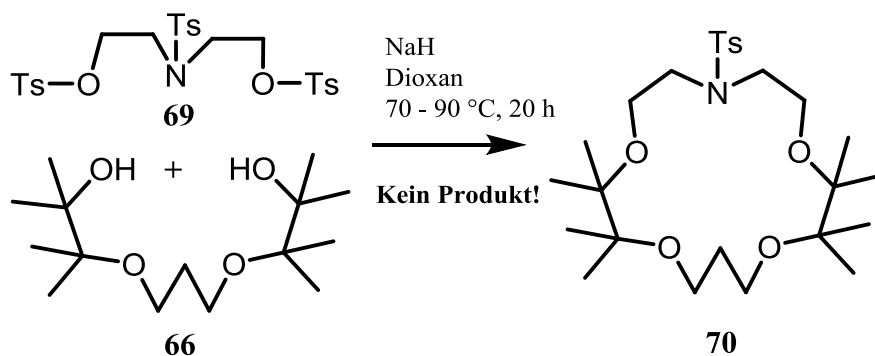


Abb. 79: Reaktion von N,O,O'-Tri(tolyl-4-sulfonyl)diethanolamin **69** und 1,1,2,2,8,8,9,9-Octamethyl-3,7-dioxanonan-1,9-diol **66**.

Da die *Williamson-Ethersynthese* kein Produkt hervorbrachte, kam die Herstellung des Kronenethers über eine Veresterung zur Anwendung. Iminodiessigsäure wurde tosyliert und zum Säurechlorid **72** umgesetzt,⁶⁵ dieses wurde anschließend unter starker Verdünnung mit dem Diol **66** umgesetzt. Zuerst wurden ähnliche Bedingungen wie bei

Ergebnisse und Diskussion

Mikhuraund und Formanovskii angewendet, d.h. beide Ausgangsstoffe wurden in Toluol unter Rückfluss bei hoher Verdünnung mit Pyridin umgesetzt, was jedoch keinen Erfolg brachte.⁶⁵ Nachdem als Base NaH eingesetzt wurde, ließ sich das Produkt **73** mit 3 %iger Ausbeute isolieren (Abb. 80).

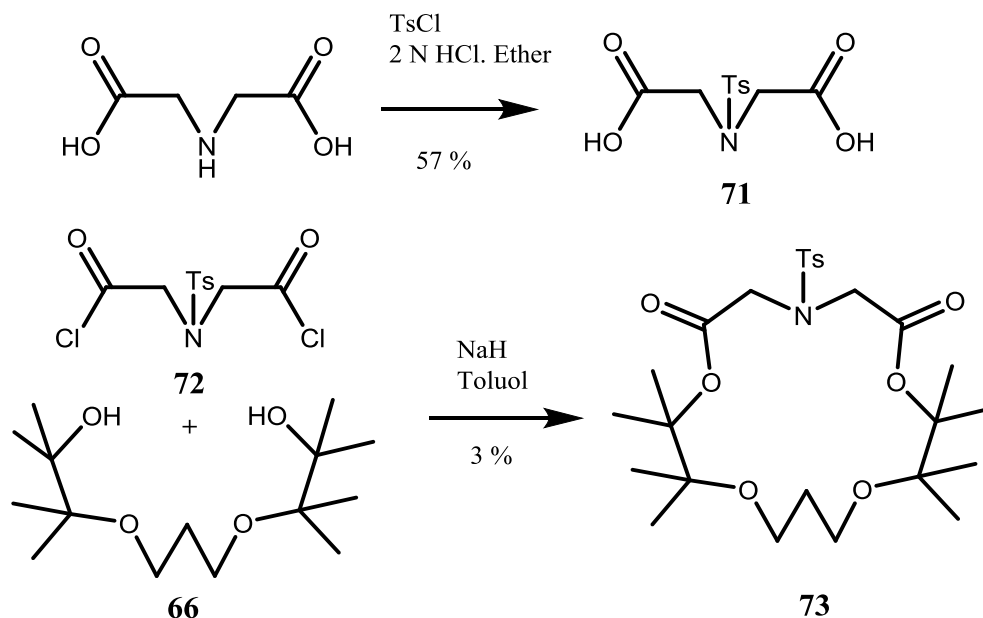


Abb. 80: Synthese von N-Tosyl-Iminodiessigsäure **71** aus Iminodiessigsäure, und Veresterung des Säurechlorids **72** mit 1,1,2,2,8,8,9,9-Octamethyl-3,7-dioxanonan-1,9-diol **66** zum 2,2,3,3,11,11,12,12-octamethyl-7-tosyl-1,4,10,13-tetraoxa-7-azacyclohexadecan-5,9-dion **73**.

Da die Ausbeute nicht weiter gesteigert werden konnte, wurden weitere Versuche unternommen, das Produkt **73** zu synthetisieren. Da sich tertiäre Alkohole oft leicht mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) verestern lassen, wurde N-Tosyl-Iminodiessigsäure mit **66**, DCC und Dimethylaminopyridin (DMAP) umgesetzt.⁶⁶ Es konnte kein Produkt identifiziert oder isoliert werden. Auch basenkatalysierte Umesterung von N-Tosyl-Iminodiessigsäuremethylester mit **66** brachte keinen entsprechenden Kronenether hervor.^{67, 68} Parallel zu den Arbeiten am Ionophor wurden einfache Fluoreszenzfarbstoffe gewonnen, um sie in einer nukleophilen Aromatensubstitution mit dem Ionophor umzusetzen. Aus 2-Aminothiophenol und der entsprechenden Benzoesäure⁶⁹ wurde 2-(4'-fluorphenyl)-1,3-benzothiazol **74** und aus 2-Aminothiophenol und dem entsprechenden Aldehyd⁷⁰ 2-(4'-fluor-3'-methoxyphenyl)-1,3-benzothiazol **75** hergestellt (Abb. 81).

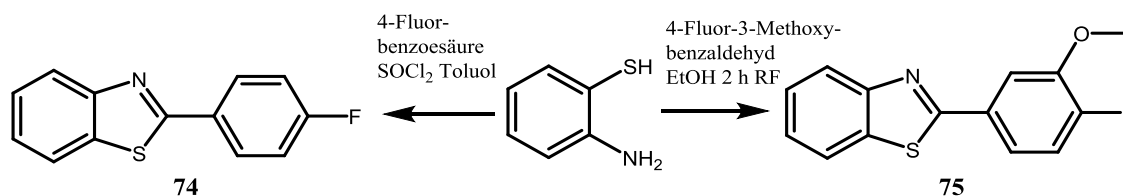


Abb. 81: Synthese von Fluorphenyl-1,3-benzothiazolen **74** und **75** aus 2-Aminothiophenol.

3.5.3 Diskussion

Über die von Suzuki et al. vorgestellten *Williamson-Ethersynthese* wurde kein [16]Krone-5-Derivat gewonnen. Nur bei der Veresterung konnte das [16]Krone-5-Derivat **73** erhalten werden, was auf die geringe Reaktivität des tertiären Alkohols **66** zurückzuführen war. Dies erforderte drastische Reaktionsbedingungen und führte zu Nebenreaktionen wie Polymerisationen. Zwar sind die Ausgangsstoffe für **72** und **66** günstig zu erhalten, womit die Synthese größerer Mengen, auch bei einer Ausbeute von 3 %, von **73** möglich wäre. Aber, um ein [16]Krone-5-Farbstoff-Derivat zu erhalten, sind einige weitere Reaktionen notwendig. Nach der Hydrierung muss die Abspaltung der Tosylschutzgruppe erfolgen. Anschließend müsste das Ionophor am Fluorophor über eine nukleophile Aromatensubstitution oder über eine *Hartwig-Buchwald-Reaktion* gebunden werden. Erstere bringt meist schlechte Ausbeuten mit sich und letztere zeigt in den meisten Fällen erst nach einer längeren Optimierung gute Ausbeuten.⁷¹ Aus allen genannten Gründen schien es nicht sinnvoll, diese Strategie weiter zu verfolgen. Die Entwicklung neuer Natriumionophore auf der Basis vom [2.1.1]- und von Diaza-[15]Krone-5-Derivaten schien geeigneter.

3.6 Zellbiologische Untersuchungen ausgewählter Ionophor-Farbstoff-Strukturen

Damit eine Indikatorstruktur zur Messung der intrazellulären Natriumionen-konzentration geeignet ist, muss sie zuerst in die Zelle gelangen. Um zu untersuchen, welche von den Ionophor-Farbstoff-Strukturen von den Zellen aufgenommen werden, wurden HEK-293 oder COS-7 Zellen mit den Diaza-[15]Krone-5-Ionophor-Farbstoff-Strukturen **13**, **12**, **14**, **15**, **19**, **17**, **23** und der [2.1.1]-Farbstoff-Struktur **42** inkubiert (Abb. 82). Im Anschluss wurden die Zellen unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510) betrachtet, um zu überprüfen, ob die Indikatoren von den Zellen aufgenommen werden und wie sie sich verteilten (siehe Abschnitt 5.6.1). Um zellspezifische Effekte auszuschließen wurden zwei Zelltypen verwendet.

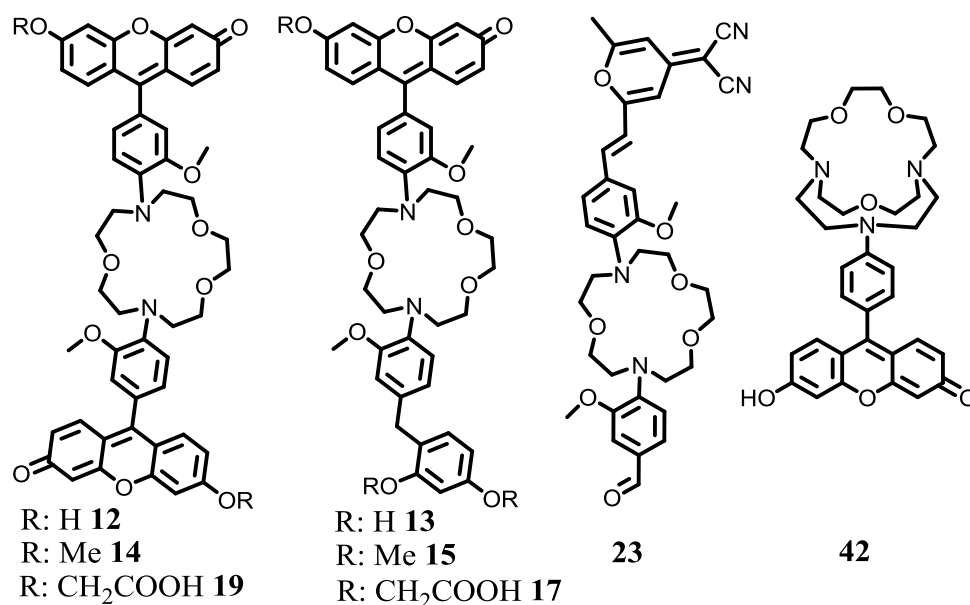


Abb. 82: Untersuchte Ionophor-Farbstoff-Strukturen.

Eine zur Messung der intrazellulären Na⁺-Konzentration geeignete Indikatorstruktur muss nicht nur in die Zelle gelangen, sondern es auch gestatten, die Änderungen der intrazellulären Na⁺-Konzentration zu verfolgen. Eine solche Änderung wurde durch Inhibierung der Na-K-ATPase mit Ouabain herbeigeführt. Da die Indikatorstrukturen **13** und **17** eine starke Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz zeigten und K_d-Werte in einem günstigen Bereich aufwiesen, wurde mit ihnen die Änderungen der intrazellulären Na⁺-Konzentration verfolgt. Kulturzellen wurden mit den Indikatorstrukturen **13** und **17**

inkubiert und die Na-K-ATPase wurde inhibiert. Mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510) wurde in einer Zeitserie verfolgt, wie sich, nach dem Zusammenbruch des Ionengradienten die Fluoreszenz änderte (siehe Abschnitt 5.6.2).

3.6.1 Zellbiologische Untersuchung der Indikatorstruktur **13**

3.6.1.1 Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit **13**

Die HEK-293 und COS-7 Zellen wurden mit **13** inkubiert und unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510) untersucht. Der Indikator **13** wurde sowohl von HEK-293 als auch von COS-7 Zellen aufgenommen und verteilte sich relativ gleichmäßig in den Zellen, reicherte sich aber in der Nähe des Zellkerns verstärkt an. Bei den COS-7 Zellen färbte **13** zusätzlich Bereiche im Zellkern.

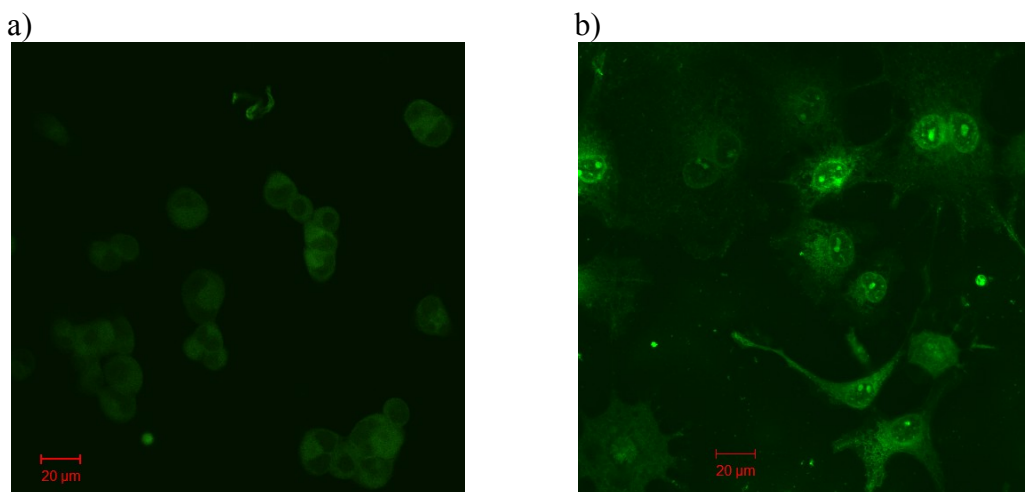


Abb. 83: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von **13:**

a) HEK-293 Zellen Die Zellen wurden mit 2,5 µl **13** (5 mM) 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Anregung erfolgte bei 488 nm (20 % Laserleistung, 40x-Objektiv). **b) COS-7 Zellen** Die Zellen wurden mit 2,5 µl **13** (5 mM) 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Anregung erfolgte bei 488 nm (10 % Laserleistung, 40x-Objektiv). Die Länge des Balkens entspricht 20 µm.

3.6.1.2 Messung der Fluoreszenzänderung von **13** in HEK-293 Zellen bei inhibierter Na-K-ATPase

Es wurde eine Zeitserie (LSM 510) von HEK-293 Zellen aufgenommen. Zuerst wurde die Fluoreszenz ohne **13** gemessen um einen Leerwert zu erhalten. Nach 7 min wurde **13** zugegeben (1. Pfeil), die Fluoreszenzintensität stieg an. Nachdem die Fluoreszenz konstant blieb (16 min später) wurde Ouabain (10 µM; 2. Pfeil) zugegeben. Nach der Zugabe von Ouabain stieg durch die Inhibierung der Na-K-ATPase die

Ergebnisse und Diskussion

Natriumionenkonzentration in der Zelle stark an. Die Erhöhung der Natriumionenkonzentration führte bei **13** zu einer starken Zunahme der Fluoreszenzintensität.

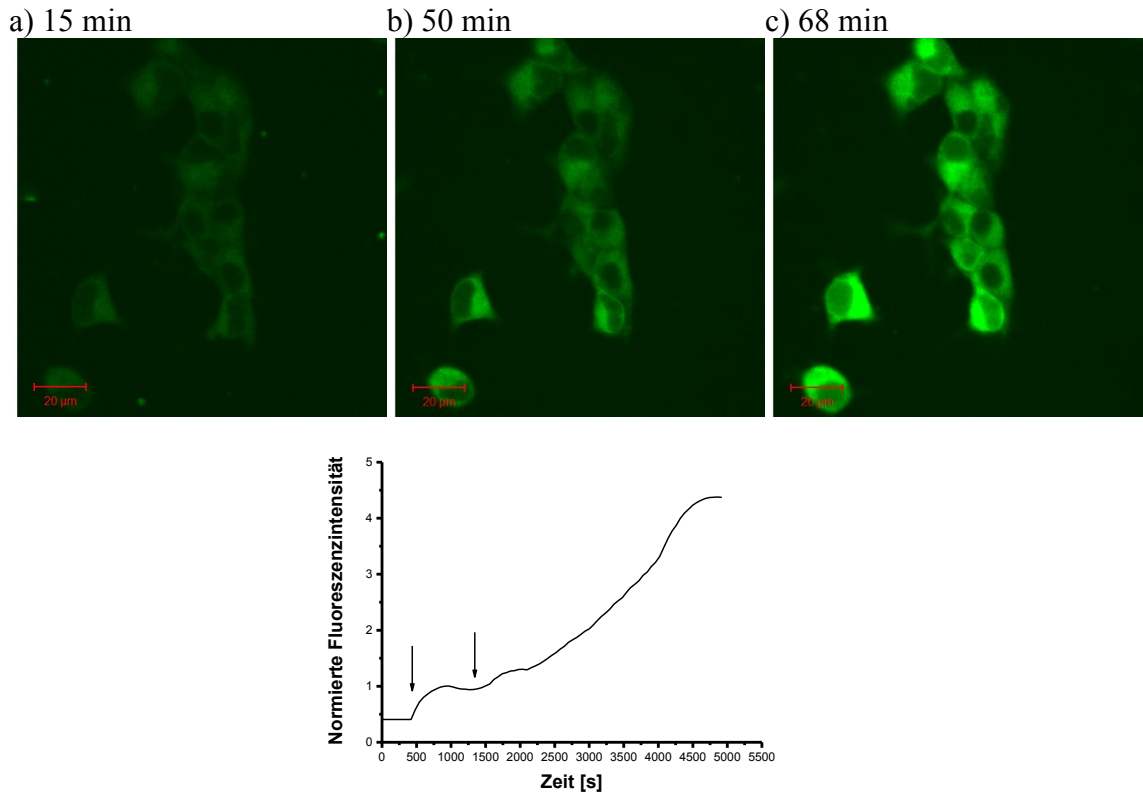


Abb. 84: Fluoreszenzmikroskopische Zeitserienaufnahmen von HEK-293 Zellen

Es wurde eine Zeitserie aufgenommen. Nach 7 min wurde 1,25 μl **13** (5 mM) zugegeben (1. Pfeil). Nach etwa 23 min wurde 1,25 μl Ouabain (10 mM) zugegeben (2. Pfeil). Die Fluoreszenzintensität nach der Zugabe von **13** wurde auf 1 normiert. Die Bilder der Proben wurden nach 15 (a), 50 (b) und 68 min (c) aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 488 nm (3 % Laserleistung, 63x-Objektiv). Die Länge des Balkens entspricht 20 μm.

3.6.2 Beladung von HEK-293 und Zellen mit **12**

Auch Indikator **12** wurde während der Inkubation von den HEK-293 Zellen aufgenommen und verteilte sich gleichmäßig im Innern der Zellen. Der Indikator reicherte sich aber ebenfalls in der Nähe des Zellkerns an.

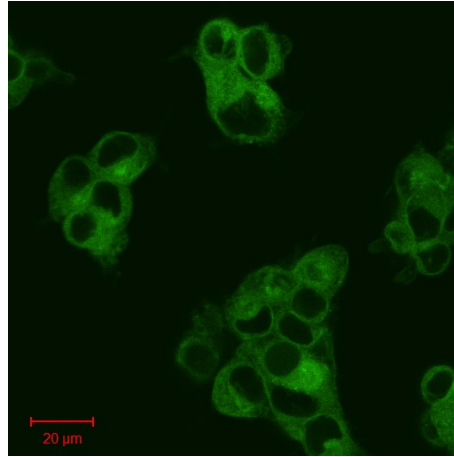


Abb. 85: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von 12 in HEK-293 Zellen

Die Anregung erfolgte bei 488 nm (70 % Laserleistung, 40x-Objektiv). Die Länge des Balkens entspricht 20 µm.

3.6.3 Zellbiologische Untersuchung der Indikatorstruktur 17

3.6.3.1 Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit 17

HEK-293 und COS-7 Zellen wurden mit **17** inkubiert. Der Indikator reichte sich in der Nähe des Zellkerns an, zeigte aber ansonsten eine relativ gleichmäßige Verteilung in der Zelle. Beim Indikator **17** wurde nur eine schwache Färbung von HEK-293 und COS-7 Zellen beobachtet. Die stark natriumabhängige Fluoreszenz von **17**, in Verbindung mit einem K_d -Wert von 48 mM, führte zu einer schwachen Fluoreszenz in den Zellen. Im folgenden Experiment, mit inhibierter Na-K-ATPase, konnte die Verteilung des Indikators, auf Grund der erhöhten Natriumionenkonzentration, besser beobachtet werden.

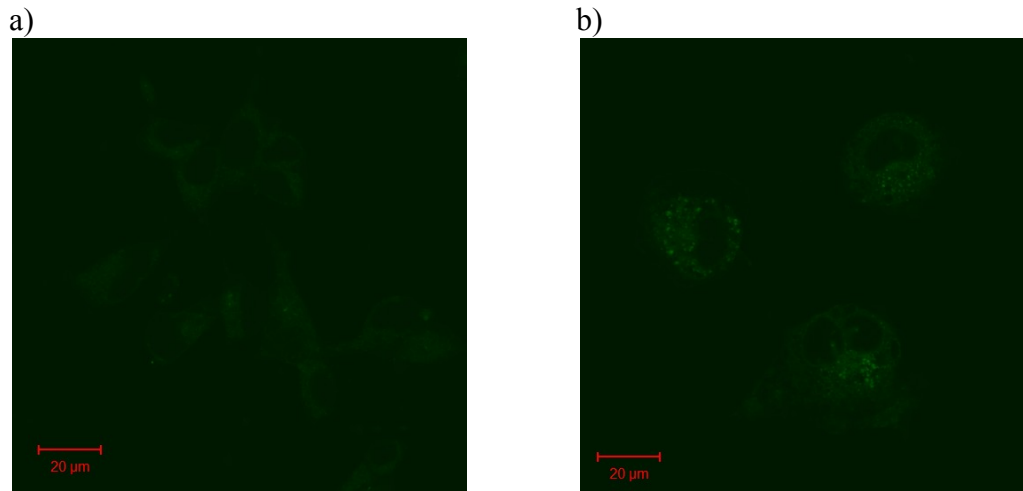


Abb. 86: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 17:

a) HEK-293 Zellen Die Anregung erfolgte bei 488 nm (100 % Laserleistung, 63x-Objektiv). **b) COS-7 Zellen** Die Anregung erfolgte bei 488 nm (100 % Laserleistung, 63x-Objektiv). Die Länge des Balkens in jedem Bild entspricht 20 µm.

3.6.3.2 Messung der Fluoreszenzänderung von **17** in HEK-293 und COS-7 Zellen bei inhibierter Na-K-ATPase

Es wurde eine Zeitserie (LSM 510) von HEK-293 Zellen aufgenommen. Analog zum Experiment bei **13** wurde zuerst ein Leerwert gemessen, dann nach 9 min **17** zugegeben (1. Pfeil), gefolgt von Ouabain (12 min später; 10 µM; 2. Pfeil). Ohne Indikator konnte die Autofluoreszenz der HEK-293 Zellen beobachtet werden. Nach der Zugabe des Indikators änderte sich die Fluoreszenz in den Zellen nicht, aber zwischen den Zellen stieg sie an. Dies erscheint logisch, da der berechnete K_d -Wert von **17** (42 mM) über dem Bereich der zellulären Na^+ -Konzentration (5 – 15 mM) lag und außerhalb der Zelle die Na^+ -Konzentration höher war. Die Erhöhung der Natriumionenkonzentration in den Zellen führte bei **17** zu einer starken Zunahme der Fluoreszenzintensität. Dieses Gesamtbild zeigte sich auch bei der Messung mit COS-7 Zellen.

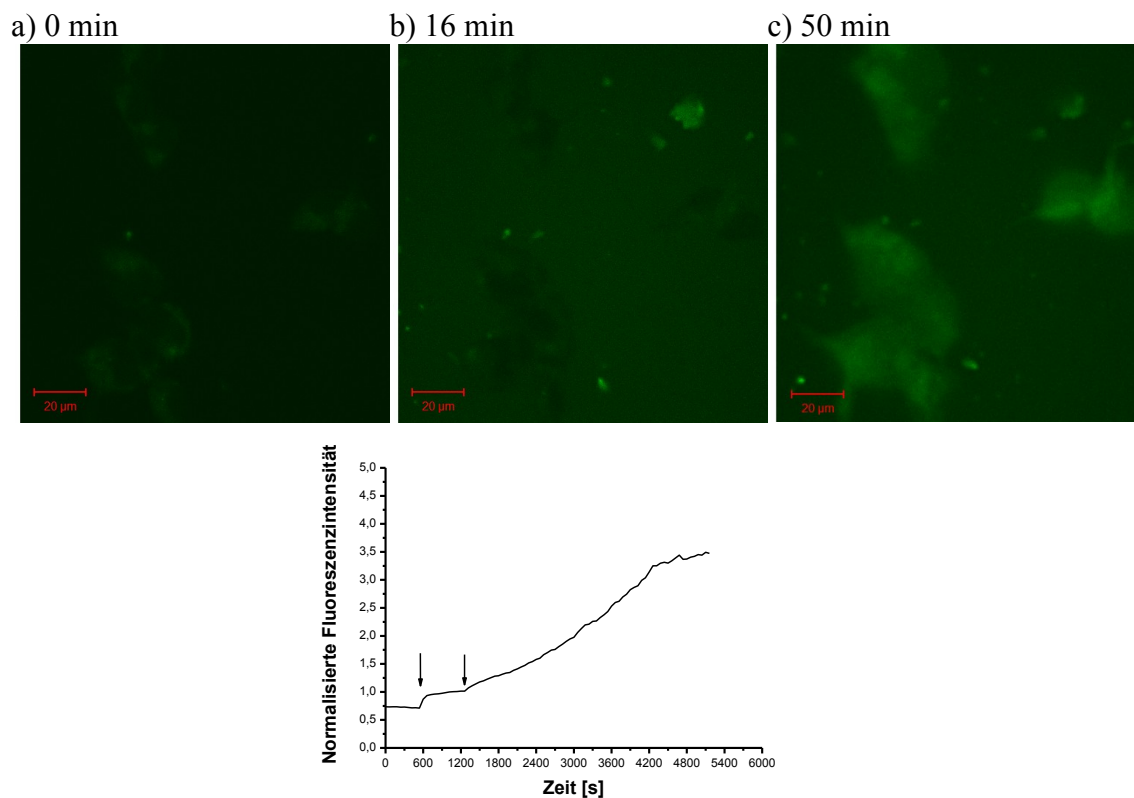


Abb. 87: Fluoreszenzmikroskopische Zeitserienaufnahmen von HEK-293 Zellen

Es wurde eine Zeitserie aufgenommen. Nach 9 min wurde 1,25 μl **17** (5 mM) zugegeben (1. Pfeil). Nach etwa 20 min wurde 1,25 μl Ouabain (10 mM) zugegeben (2. Pfeil). Die Fluoreszenzintensität nach der Zugabe von **17** wurde auf 1 normiert. Die Bilder der Proben wurden nach 0 (a), 16 (b) und 50 min (c) aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 488 nm (15 % Laserleistung, 63x-Objektiv). Die Länge des Balkens entspricht 20 μm .

Ergebnisse und Diskussion

In der gleichen Weise wurde eine Zeitserie (LSM 510) von COS-7 Zellen aufgenommen. Nach 9 min wurde **17** (5 μ M) zugegeben (1. Pfeil) und 33 min später Ouabain (10 μ M; 2. Pfeil).

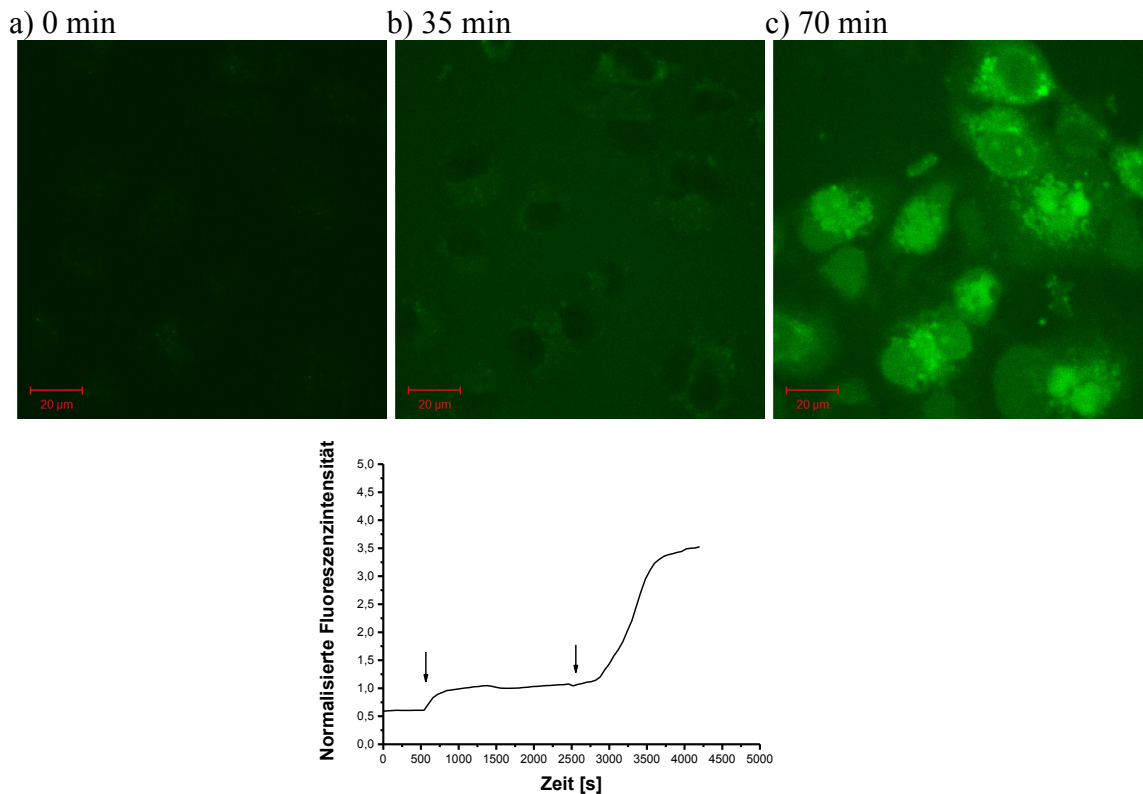


Abb. 88: Fluoreszenzmikroskopische Zeitserienaufnahmen von COS-7 Zellen

Es wurde eine Zeitserie aufgenommen. Nach 9 min wurde 1,25 μ l **17** (5 mM) zugegeben (1. Pfeil). Nach etwa 42 min wurde 1,25 μ l Ouabain (10 mM) zugegeben (2. Pfeil). Die Fluoreszenzintensität nach der Zugabe von **17** wurde auf 1 normiert. Die Bilder der Proben wurden nach 0 (a), 35 (b) und 70 min (c) aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 488 nm (15 % Laserleistung, 63x-Objektiv). Die Länge des Balkens entspricht 20 μ m.

3.6.4 Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit **19**

Auch Indikator **19** wurde während der Inkubation von den Zellen aufgenommen. Beim Indikator **19** wurde, trotz Laserleistung von 100 %, nur eine sehr schwache Färbung von HEK-293 und COS-7 Zellen beobachtet. Die Ursache der schwachen Fluoreszenz war die geringe Quantenausbeute in Verbindung mit einem hohen K_d -Wert.

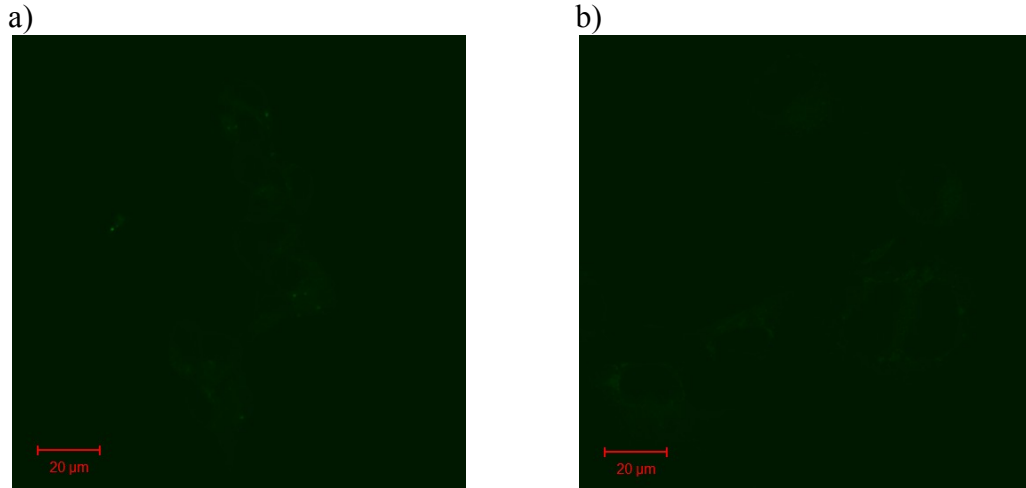


Abb. 89: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 19:

a) HEK-293 Zellen Die Anregung erfolgte bei 488 nm (100 % Laserleistung, 63x-Objektiv). **b) COS-7 Zellen** Die Anregung erfolgte bei 488 nm (100 % Laserleistung, 63x-Objektiv). Die Länge des Balkens entspricht 20 μm.

3.6.5 Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit 14

Die HEK-293 und COS-7 Zellen wurden mit **14** inkubiert. Derivat **14** wurde von HEK-293 Zellen wenig aufgenommen und verteilte sich relativ gleichmäßig in der Zelle, reicherte sich aber in der Nähe des Zellkerns an. Von den COS-7 Zellen wurde Derivat **14** deutlich besser aufgenommen und färbte den Bereich um den Zellkern und Strukturen im Zellkern besonders stark.

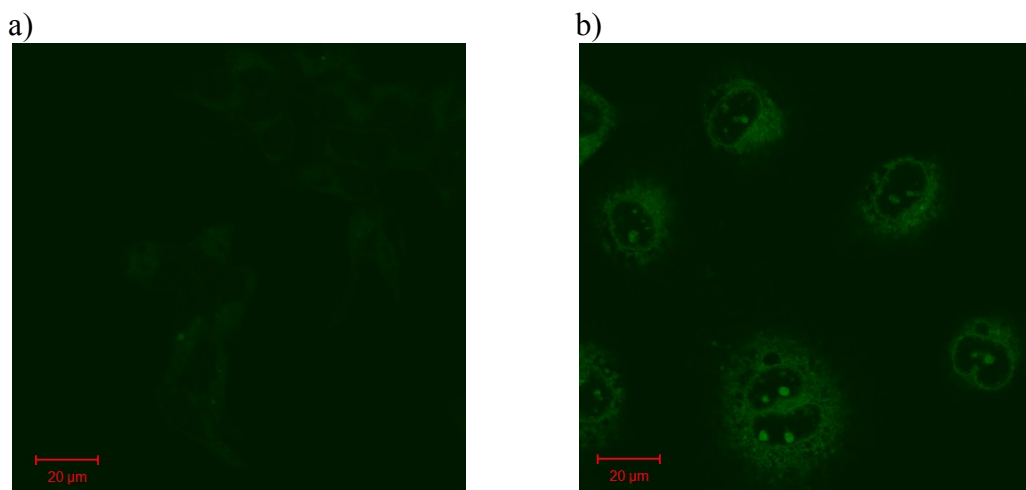


Abb. 90: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 14:

a) HEK-293 Zellen Die Anregung erfolgte bei 488 nm (100 % Laserleistung, 63x-Objektiv). **b) COS-7 Zellen** Die Anregung erfolgte bei 488 nm (100 % Laserleistung, 63x-Objektiv). Die Länge des Balkens entspricht 20 μm.

3.6.6 Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit 15

Indikator **15** wurde von den Zellen aufgenommen und verteilte sich gleichmäßig im Innern der Zellen.

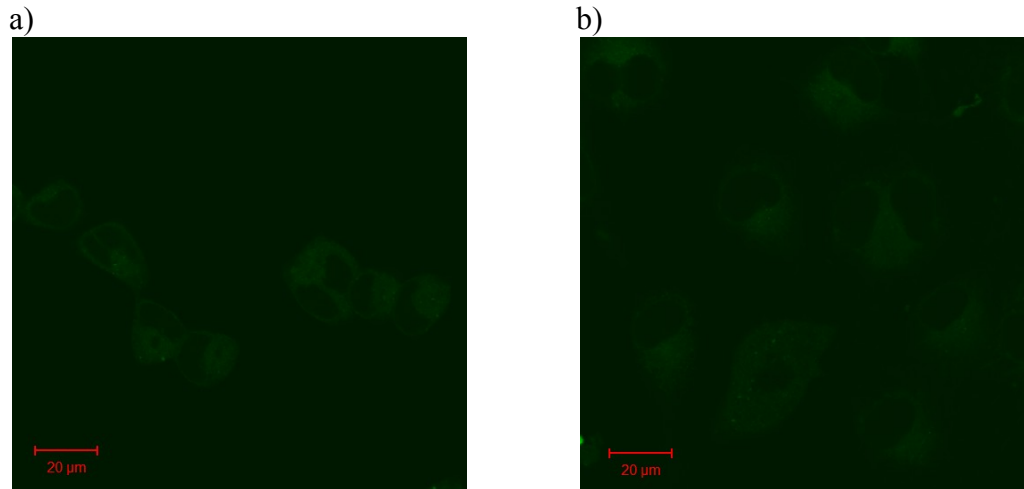


Abb. 91: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 15:

a) HEK-293 Zellen Die Anregung erfolgte bei 488 nm (100 % Laserleistung, 63x-Objektiv). **b) COS-7 Zellen** Die Anregung erfolgte bei 488 nm (100 % Laserleistung, 63x-Objektiv). Die Länge des Balkens entspricht 20 µm.

3.6.7 Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit 23

Der Farbstoff **23** wurde von HEK-293 und COS-7 Zellen aufgenommen, verteilte sich relativ gleichmäßig in der Zelle, trat aber an mehreren Punkten inner- und außerhalb der Zelle konzentriert auf. Die Fluoreszenz war, trotz der geringen gemessenen Quantenausbeute, in der Zelle hoch.

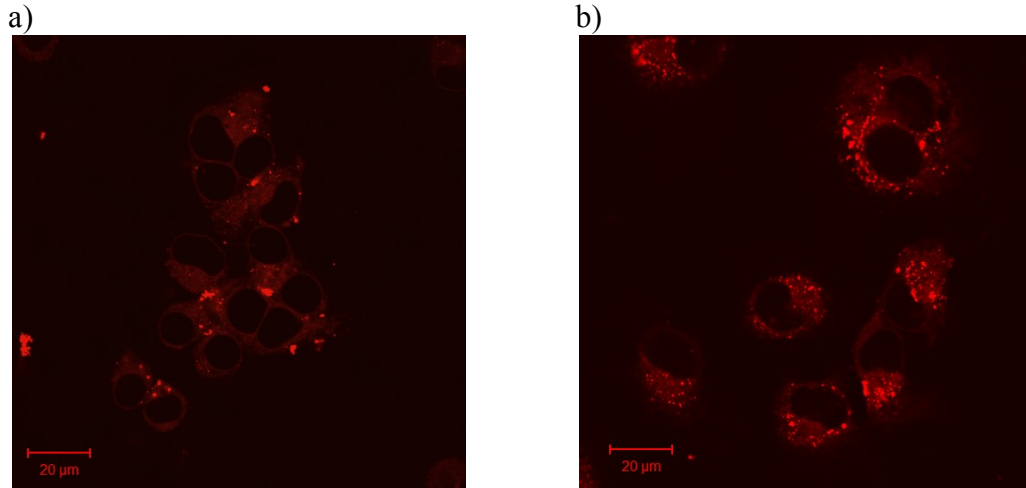


Abb. 92: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 23:

a) HEK-293 Zellen Die Anregung erfolgte bei 488 nm (2 % Laserleistung, 63x-Objektiv). **b) COS-7 Zellen** Die Anregung erfolgte bei 488 nm (2 % Laserleistung, 63x-Objektiv). Die Länge des Balkens entspricht 20 µm.

3.6.8 Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit 42

Das [2.1.1]-Farbstoff-Derivat **42** wurde sowohl von HEK-293 als auch von COS-7 Zellen aufgenommen. Er reichte sich in Teilen der Zelle punktförmig an und schien besonders Intrazelluläre Membranen anzufärben. In COS-7 Zellen färbte **42** zusätzlich Strukturen im Zellkern.

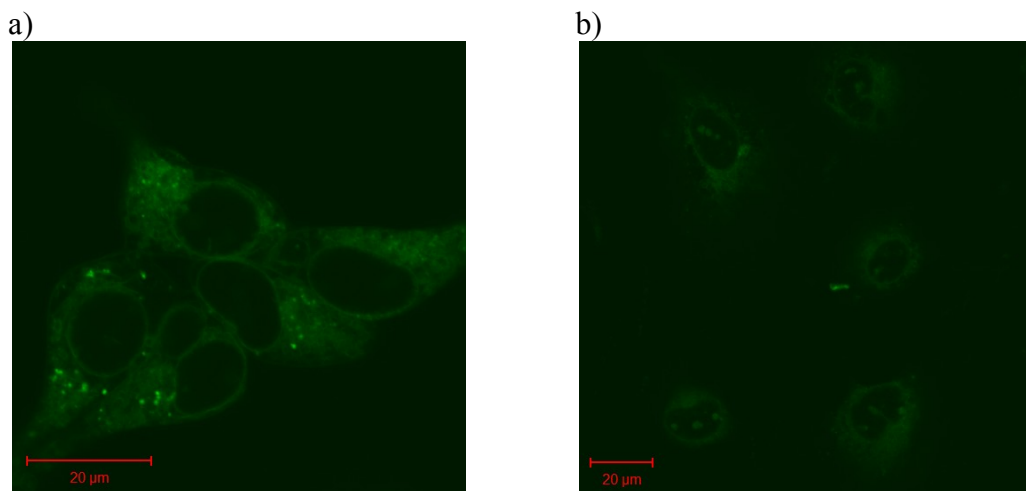


Abb. 93: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 42:

a) HEK-293 Zellen Die Anregung erfolgte bei 488 nm (90 % Laserleistung, 63x-Objektiv). **b) COS-7 Zellen** Die Anregung erfolgte bei 488 nm (100 % Laserleistung, 63x-Objektiv). Die Länge des Balkens entspricht 20 µm.

3.6.9 Diskussion

Die in diesem Abschnitt untersuchten Fluoroionophore wurden relativ gut von HEK-293 und COS-7 Zellen aufgenommen. Die Indikatoren **12** und **13** verteilten sich homogen in den HEK-293 Zellen. In den COS-7 Zellen reichte sich **13**, wie auch viele andere Strukturen, in Zellkernnähe an. Die meisten Fluoroionophore zeigten, auch bei hoher Laserleistung, nur eine schwache Fluoreszenz. Bei den Farbstoffen **17** und **19** war dies zu erwarten, da sie beide hohe Dissoziationskonstanten und eine geringe QA aufwiesen. Die Strukturen **23** und **13** zeigten, schon bei geringer Laserleistung, eine intensive Fluoreszenz. Bei **13** war dieses Resultat, wegen des geringen K_d -Wertes, zu erwarten. Bei Derivat **23**, welches in Lösung, nur eine sehr schwache Fluoreszenz und eine geringe QA zeigte, ist dieses Verhalten wahrscheinlich auf die veränderte Umgebung in der Zelle zurückzuführen. Manche Verbindungen färbten Strukturen im Zellkern.

Mit **13** und **17** gelang es, in Zellen nach Inhibierung der Na-K-ATPase mit Ouabain die Zunahme der intrazellulären Natriumionenkonzentration zu verfolgen. Da Indikator **13** einen geringeren K_d -Wert aufwies, sich homogener in den Zellen verteilte und einen stärkeren Anstieg der Fluoreszenz bei Erhöhung der Na^+ -Konzentration zeigte, ist er am besten geeignet, um die Zunahme der intrazellulären Na^+ -konzentration zu verfolgen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Drei verschiedene Ionophorklassen dienten in dieser Arbeit als Grundlage, um neue Natriumionenindikatoren für die Anwendung in lebenden Zellen zu gewinnen. Für das bekannte Diaza-[15]Krone-5-Ionophor **7** wurde ein einfacher und schneller Syntheseweg entwickelt. Trotz einer aufwendigen Synthese und Aufreinigung konnte für das neue [2.1.1]-Ionophor **40** ebenfalls ein Syntheseweg etabliert werden. Die Synthese eines [16]Krone-5 Ionophors gelang nicht. Die beiden synthetisierten Ionophore wurden vollständig charakterisiert und bei beiden konnten Röntgenkristallstrukturen gewonnen werden. Das Diaza-[15]Krone-5-Ionophor **7** und das [2.1.1]-Ionophor **40** verfügten über Aldehydgruppen, die sich zu verschiedenen Xanthen-, Styryl- und Rhodaminderivaten umsetzen ließen.

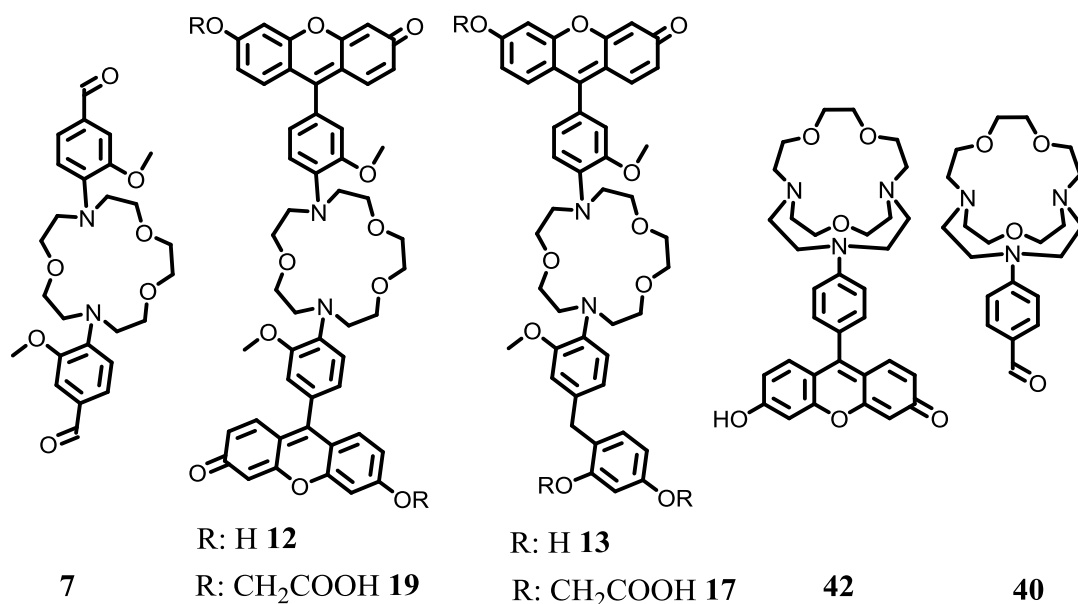


Abb. 94: Strukturen des Diaza-[15]Krone-5-Ionophors **7**, der Diaza-[15]Krone-5-Xanthen-Derivate **12**, **13**, **19** und **17**, des [2.1.1]-Ionophors **40** und des [2.1.1]-Xanthen-Derivats **42**.

Die meisten Fluoroionophore, besonders die Xanthenderivate, besaßen eine relativ breite Absorptionsbande im Bereich von 480 - 490 nm, wodurch sie mit den gängigen 488 nm Lasern angeregt werden können. Die Emission lag bei allen Farbstoffen über 500 nm, womit eine Überlagerung mit der Autofluoreszenz der Zelle unwahrscheinlich ist.

Zusammenfassung und Ausblick

Die ermittelten Quantenausbeuten der Farbstoffe waren gering und lagen im Bereich von 0,2 % bis 13 %. Indikator **17** und **13** zeigten eine starke Natriumabhängigkeit der Quantenausbeute. Da bei allen Fluoroionophoren auch der Extinktionskoeffizient (ϵ) gering war, ergab sich eine geringe *Brightness* ($\epsilon \cdot \Phi$).

Tab. 4 Eigenschaften der Diaza-[15]Krone-5-Xanthen-Derivate **13, **12**, **19**, **17** und des [2.1.1]-Xanthen-Derivats **42**.**

Die Messungen wurden in 10 mM Hepes-Lösung bei pH 7,4 durchgeführt.

Indikator	13	12	19	17	42
$\lambda_{\text{max, ex}}$ [nm]	494	494	470	470	493
$\lambda_{\text{max, em}}$ [nm]	514	514	519	519	519
ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	15940	25281	18238	13324	39809
Stokes Shift [nm]	20	20	49	49	26
Φ (0 mM Na^+ /150 mM Na^+) [%]	0,2/1,2	0,5/0,3	0,2/0,6	0,2/3,2	13,7
<i>Brightness</i> ($\epsilon \cdot \Phi$, 0 mM Na^+ /150 mM Na^+) [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	32/191	126/76	36/109	27/426	5454
K_d (Na^+ + TMA $^+$) [mmol/l]	10	16,3	117	42,5	n.v.
F_{max} (Na^+ + TMA $^+$)	8	2	5,3	16,9	n.v.
K_d (Na^+ + K $^+$) [mmol/l]	25,4	32,8	125	48	n.v.
F_{max} (Na^+ + K $^+$)	4,8	1,7	5,3	18,9	n.v.
F (100 mM K $^+$)/ F (0 mM K $^+$)	1,2	1,1	1,05	1	n.v.

Die Diaza-[15]Krone-5-Farbstoff-Derivate **12**, **13**, **17** und **19** zeigten eine Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz. Derivat **13** wies mit 10 mM den niedrigsten K_d -Wert aller untersuchten Substanzen auf. Der K_d -Wert von **12** betrug 16 mM. In Gegenwart von K $^+$ zeigte **13** einen K_d -Wert von 25,4 mM und **12** einen K_d -Wert von 32,8 mM. Die Indikatoren **12** und **13** zeigten eine Zeit- und pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz, die durch Alkylierung mit Bromessigsäure-*tert*-butylester unterbunden werden konnte.

Die Dissoziationskonstanten der Methylencarboxy-Derivate **17** und **19** betrugen 43 mM bzw. 117 mM in Gegenwart von TMACl. Vergleicht man diese K_d -Werte mit den in Gegenwart von KCl gemessenen Werten, zeigt sich ein interessanter Effekt der Alkylierung. Die Dissoziationskonstante von **17** in Gegenwart von KCl betrug 48 mM

und die von **19** 125 mM. Beide Werte waren damit fast gleich groß wie die in Gegenwart von TMACl gemessenen K_d -Werte, d.h. das Kaliumion verdrängte das Natriumion nicht mehr von der Bindungsstelle. Mit **17** und **19** konnten Indikatoren mit einer hohen Na^+ -Selektivität hergestellt werden. Die Alkylierung verringerte nicht nur die Zeit- und pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz, sondern erhöhte auch die Natriumionenselektivität und die Dissoziationskonstante. Die Fluoroionophore **13** und **17**, mit nur einem Farbstoff, zeigten deutlich bessere Eigenschaften als die Derivate mit zwei Fluorophoren (**12** und **19**). Neben den Dissoziationskonstanten sind auch F_{max} und die Quantenausbeuten deutlich besser. Durch Verwendung von Halogenderivaten könnten bei den Derivaten **12** und **13** die Zeit- und pH-Abhängigkeit verringert werden, ohne dass der K_d -Wert beeinflusst wird.

Keines der hergestellten [2.1.1]-Farbstoff-Derivate zeigte eine Fluoreszenzänderung bei Natriumzugabe. Mit [2.2.1] konnten die gebundenen Ionen entfernt und zumindest qualitativ gezeigt werden, dass eine starke Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz bestand. Die Dissoziationskonstante des [2.1.1]-Derivates muss, für die Anwendung in lebenden Zellen erhöht werden, ohne dabei die Natriumselektivität zu verschlechtern. Durch Substitution der Sauerstoffatome durch Stickstoff, oder durch Einführen aromatischer Gruppen könnte der K_d -Wert in die gewünschte Richtung beeinflusst werden.

Die meisten Fluoroionophore wurden gut von HEK-293 und COS-7 Zellen aufgenommen. Mit Indikator **17** und **13** konnte die Erhöhung der Natriumionenkonzentration in Zellen, nach Inhibierung der Na-K-ATPase, verfolgt werden.

Insgesamt wies Fluoroionophor **13** die besten Eigenschaften auf: Die Absorption und Emission lag in einem günstigen Bereich. Indikator **13** wurde von HEK-293 und COS-7 Zellen gut aufgenommen und verteilte sich, besonders in HEK-293 Zellen, homogen. Der K_d -Wert war mit 10 mM sehr niedrig und lag im physiologischen Bereich. Die Erhöhung der Natriumionenkonzentration in HEK-293 Zellen, nach Inhibierung der Na-K-ATPase, konnte gut verfolgt werden.

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der Arbeit wurden vier neue Natriumindikatoren, mit einem oder zwei Fluorophoren, gewonnen, die interessante Unterschiede in ihren Eigenschaften zeigten. Ein Problem, das bei allen vier Indikatoren auftrat, war die geringe Quantenausbeute. In zukünftigen Arbeiten könnte durch Verlängerung des Linkers zwischen Ionophor und Farbstoff der Einfluss des Ionophors auf den Farbstoff verringert und somit die Quantenausbeute erhöht werden. Auch ein Übergang zu Fluoresceinderivaten könnte die Quantenausbeute positiv beeinflussen. Um den Mechanismus der Signaltransduktion besser zu untersuchen, bietet es sich an, die Fluoreszenzlebensdauern zu messen, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, da der hierfür notwendige Versuchsaufbau nicht fertiggestellt werden konnte.

5 Experimenteller Teil

5.1 Reagenzien und Geräte

5.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien wurden aus dem Handel (ACROS, FLUKA, SIGMA-ALDRICH, ROTH, MERCK) bezogen und sind, soweit nicht anders beschrieben, ohne weitere Reinigung eingesetzt worden. Die für die Reaktionen verwendeten Lösungsmittel wurden von ROTH in der benötigten Reinheit bezogen, verwendete trockene Lösungsmittel wurden von Roth (ROTIDRY[®]) bezogen oder durch Trocknen mit Molsieb (3 - 4 Å) hergestellt.

5.1.2 Chromatographie

Die Reaktionsverläufe wurden dünnschichtchromatographisch mit POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (0,2 mm Kieselgel, MACHEREY-NAGEL), POLYGRAM ALOX N/UV₂₅₄ (0,2 mm Aluminiumoxid, MACHEREY-NAGEL) oder DC-KIESELGEL 60 RP-18 F₂₅₄ (0,2 mm Kieselgel RP-18, MERCK KGaA) verfolgt. Einige Verbindungen wurden mit Iod, Molybdätdiäthylphosphorsäure- oder Anisaldehyd-Lösung angefärbt. Die säulenchromatographischen Aufreinigungen erfolgten mit Kieselgel 60 (Korngröße 0,04 – 0,063 nm, ROTH), neutralem Aluminiumoxid 90 (Korngröße 0,063 – 0,2 nm, ROTH) oder Kieselgel 100 C18-Umkehrphase (Porengröße 90 Å, FLUKA). Für die präparative Dünnschichtchromatographie wurden DC-FERTIGPLATTEN SIL G-200 UV₂₅₄ (2 mm Kieselgel, MACHEREY-NAGEL) oder DC-FERTIGPLATTEN RP-18W UV₂₅₄ (1 mm RP-18-Kieselgel, MACHEREY-NAGEL) verwendet.

5.1.3 Chemische Analytik

Die ¹H- und ¹³C-NMR Spektren wurden mit Hilfe der Avance I 200 MHz, Avance I 250 MHz, Fourier 300 MHz, Avance I 400 MHz Avance III 600 MHz von BRUKER aufgenommen. Als interner Standard diente das jeweilige Lösungsmittelsignal. Bei der Auswertung wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), m (Multiplett). Die Massenspektren wurden mit einem MAT SSQ 710 bzw.

MAZ95XL von FINNIGAN sowie einem maXis impact von BRUKER aufgenommen. Die Messung der Elementaranalysen erfolgte am Varion EL III von ELEMENTAR ANALYSENSYSTEME GmbH. Die Schmelzpunkte wurden am EZ-Melt von SRS (STANFORD RESEARCH SYSTEMS) gemessen.

5.1.4 UV-Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

Die UV-Vis-Spektren wurden mit Hilfe des Lambda 650 von PERKINELMER und die Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren mit Hilfe des Quanta Master 30 von PTI oder mit Hilfe des Cary Eclipse von VARIAN gemessen. Alle Messungen erfolgten in PMMA-Küvetten (Schichtdicke: 1 cm) von SARSTEDT.

5.1.5 Mikroskopie

Für die Messungen in den Zellen wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, CARL ZEISS) mit inversem Stativ (Axiovert 200M, CARL ZEISS) verwendet. Die Zellen wurden durch ein 40x Plan-Neofluar- (numerische Apertur (NA) 0,75) oder ein 63x C-Apochromat-Objektiv (NA 1,2) betrachtet. Die in dieser Arbeit untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit der 488 nm Linie des im konfokalen Mikroskop integrierten Ar-Lasers angeregt. Anregungs- und Fluoreszenzlicht wurden durch ein 488 nm Farbteiler getrennt, mit einem 505 nm Langpassfilter gefiltert und in einem der konfokalen Kanäle gesammelt. Für einzelne konfokale Aufnahmen wurde ein Pinholedurchmesser von 120 μm gewählt, der bei dem verwendeten 40x Objektiv einer Schichtdicke von 1,9 μm und bei dem 63x Objektiv einer Schichtdicke von 1,0 μm entspricht. Bei der Messung der Zeitserien wurde die Lochblende vollständig geöffnet, um zu gewährleisten, dass das Messergebnis durch eine geringe Drift der Zellen aus Brennebene nicht verfälscht wird.

5.1.6 Puffer

Hepes-Puffer

Es wurden 100 mM Hepes-Stammlösungen hergestellt, mit festem Tetramethylammoniumhydroxid-Pentahydrat auf pH 6,8; pH 7,4 und pH 7,6 eingestellt und über einen Spritzenfilter (0,2 μm , SARSTEDT) steril filtriert. Die Messungen wurden in 10 mM Hepes-Pufferlösungen durchgeführt.

PBS-Puffer

Es wurde ein 10x PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung) mit pH 7,4 hergestellt, indem 1,37 M NaCl, 0,03 M KCl, 0,15 M Na_2HPO_4 und 0,018 M KH_2PO_4 in Wasser gelöst wurden.

5.1.7 Lösungen

Von den Ionophor-Farbstoffstrukturen **12**, **13**, **42**, **14**, **15**, **17**, **23** und **19** wurden 5 mM Stammlösungen in DMSO hergestellt. Von Ouabain (SIGMA) wurde eine 10 mM Stammlösung in DMSO hergestellt.

5.1.8 Zellen

Die Anzucht der eukaryotischen Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die adhärennten Zelllinien HEK-293 und COS-7 wurden im Standardnährmedium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, GIBCO®) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS, BIOCHROM AG) bei 37 °C, 5 % CO_2 -Atmosphäre und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Trypsin/EDTA-Lösung (BIOCHROM AG) bei 37 °C im Brutschrank. Die Inkubationsdauer betrug, abhängig von der jeweiligen Zelllinie, zwischen 5 und 15 min. Sobald die Zellen eine abgerundete Morphologie zeigten und sich von der Zellkulturoberfläche ablösten, wurde zur Trypsininaktivierung vorgewärmtes Wachstumsmedium im Überschuss zugegeben. Anschließend erfolgte ein mehrmaliges vorsichtiges Mischen der Zellsuspension, um die Zellen möglichst gut zu vereinzeln und in einem entsprechenden Verhältnis in neue Gewebeskulturflaschen zu überführen.

Deckgläschen mit 25 mm Durchmesser (MENZEL) wurden mit Poly-*L*-Lysin (Poly-*L*-Lysin HBr, M 150000 – 300000, SIGMA) beschichtet, indem sie in 35 mm Petrischalen, mit 0,8 ml Poly-*L*-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) für 1h bei 37 °C inkubiert wurden. Nach dem Entfernen der Lösung wurde 2-mal mit 2 ml PBS-Lösung (steril, pH 7,4) gewaschen und mit 2,4 ml des entsprechenden Zellmediums und mit 0,1 ml der entsprechenden Zellsuspension (HEK-293 und COS-7) versetzt. Die Deckgläschen wurden für etwa 24 h bei 37 °C mit den HEK-293 oder COS-7 Zellen inkubiert.

5.2 Synthese der Diaza-[15]Krone-5-Ionophors-basierenden Natriumionenindikatoren

5.2.1 Synthese des Diaza-[15]Krone-5-Ionophors **7**

Synthesevorschrift für 4,4'-(1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7,13-diyl)bis(3-methoxybenzaldehyd) (**7**)

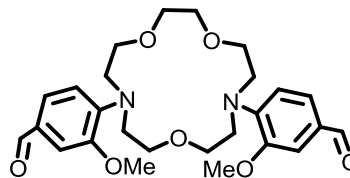
In einem 50 ml Rundkolben wurden 2 g (9,17 mmol) 1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan **5** und 3,1 g (20 mmol) 4-Fluor-3-Methoxybenzaldehyd in 10 ml DMSO und 2 Tropfen Wasser gelöst, mit 2,74 g K₂CO₃ versetzt und bei 130 °C für 72 h gerührt. Die hellgelbe Suspension wurde mit der Zeit dunkler, bis sie am Ende der Reaktion dunkelbraun war. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung auf 180 ml Wasser gegossen und 5-mal mit DCM extrahiert. Nach dem Einengen verblieben 6 g eines Öls, welches noch DMSO und viele Nebenprodukte enthielt. Es erfolgte eine Vorreinigung über eine breite Fritte mit Kieselgel 60 und MeCN als Eluent. Die vorauslaufende Fraktion wurde aufgefangen. Das erhaltene Rohprodukt wurde mit Kieselgel 60 säulenchromatographisch gereinigt. Als Eluent diente DCM mit langsam steigendem Essigesteranteil. Eine Probe von **7** konnte in einem DCM-MeOH-Gemisch kristallisiert werden. Eine weitere Probe von **7** wurde in DCM gelöst und es wurde Wasser und ein Überschuss NaPF₆ zugegeben. Die Mischung wurde geschüttelt, einen Tag stehen gelassen, die DCM Phase wurde abgetrennt und mit MeOH versetzt. Aus der DCM-MeOH-Mischung kristallisierte nach längerer Zeit der Natriumkomplex von **7** aus.

Experimenteller Teil

Summenformel: $C_{26}H_{34}N_2O_7$, Molmasse: 486,56 g/mol.

Ausbeute: 1,34 g (30 %), hellgelber amorpher Feststoff.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 509,1 (100) $[M+Na^+]$.



HR-MS (Micro-ESI pos., $[M+Na^+]$) $C_{26}H_{34}NaN_2O_7$ ber.: 509,22637; gem.: 509,22565.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 9,77 (s, 2 H, CO); 7,34 (m, 4 H, Aryl); 7,03 (m, 2H, Aryl); 3,86 (s, 6 H, CH_3); 3,69 (m, 20 H, CH_2).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 190,48; 151,09; 126,73; 109,93; 70,81; 69,38; 55,61; 53,67; 52,61.

EA für $C_{26}H_{34}N_2O_7$ ber.: C: 64,18; H: 7,04; N: 5,76. gem.: C: 64,5; H: 7,04; N: 5,76.

RKSA: fo5638.

RKSA: fo5637 (Natriumkomplex).

5.2.2 Synthese von Ionophor-7-Xanthenderivaten

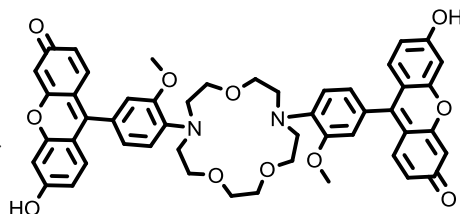
Synthesevorschrift für 9,9'-((1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7,13-diyl)bis(3-methoxy-4,1-phenyl))bis(6-hydroxy-3H-xanthen-3-on) (12) und 9-(4-(13-(4-(2,4-dihydroxybenzyl)-2-methoxyphenyl)-1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7-yl)-3-methoxyphenyl)-6-hydroxy-3H-xanthen-3-on (13)

In einem 5 ml Rundkolben wurden 200 mg (0,41 mmol) 4,4'-(1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7,13-diyl)bis(3-methoxybenzaldehyd) **7** und 192 mg (1,75 mmol) Resorcinol in 2 ml $MeSO_3H$ gelöst und bei 74°C für 16 h gerührt. Nach dem Erkalten wurde auf 20 ml 3 M NaOAc gegossen, filtriert, 3-mal mit Wasser gewaschen und getrocknet. Der erhaltene Feststoff wurde in $CHCl_3/MeOH$ (1:1) gelöst, filtriert, eingeengt und getrocknet. Bei der Synthese entstanden **12**, **13** und einige Nebenprodukte. Zur Reinigung wurde zuerst eine Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 mit $MeCN/MeOH$ (1:1) + CsCl als Eluent durchgeführt. Hierbei konnte **12** von **13** und den Nebenprodukten abgetrennt und rein erhalten werden. Derivat **13** ließ sich nur über eine präparative Dünnschichtchromatographie, mit $MeCN/MeOH$ (1:1) + CsCl als Eluent, rein erhalten.

9,9'-((1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7,13-diyl)bis(3-methoxy-4,1-phenylen))bis(6-hydroxy-3H-xanthen-3-on) (12)

Summenformel: $C_{50}H_{46}N_2O_{11}$,
Molmasse: 850,91 g/mol.

Ausbeute: 157 mg (45 %), schwarzer amorpher Feststoff.



MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 851 (100) $[M+H]^+$; 873,1 (70) $[M+Na]^+$.

HR-MS (Micro-ESI pos., $[M+H]^+$) $C_{50}H_{47}N_2O_{11}$ ber.: 851,31799; gem.: 851,31989.

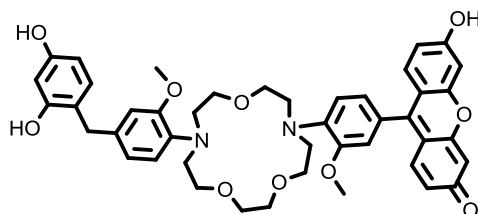
1H NMR (250 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 7,23 (m; 4 H; CH Ar); 7,1 (m; 2 H; CH Ar); 6,99 (s; 2 H; OH Ar); 6,92 (m; 4 H; CH Ar); 6,64 (m; 8 H; CH Ar); 3,77 (s; 6 H; CH_3O); 3,6 (m; 20 H; CH_2).

^{13}C NMR (63 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 151,67; 150,97; 141,75; 131,35; 124,81; 122,89; 119,0; 114,21; 71,08; 56,2; 22,95; 7,68.

9-(4-(13-(4-(2,4-dihydroxybenzyl)-2-methoxyphenyl)-1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7-yl)-3-methoxyphenyl)-6-hydroxy-3H-xanthen-3-on (13)

Summenformel: $C_{44}H_{46}N_2O_{10}$,
Molmasse: 762,84 g/mol.

Ausbeute: 150 mg (48 %), dunkelroter amorpher Feststoff.



MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 763,9 (10) $[M+H]^+$; 785,1 (100) $[M+Na]^+$.

HR-MS (Micro-ESI pos., $[M+Na]^+$) $C_{44}H_{46}NaN_2O_{10}$ ber.: 785,30501; gem.: 785,30478.

1H NMR (250 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 7,22 (d; $J = 7,5$; 1 H; CH Ar); 6,93 (m; 5 H; CH Ar); 6,78 (m; 2 H; CH Ar); 6,7 (m; 1 H; CH Ar); 6,31 (m; 3 H; CH Ar); 6,18 (m; 2 H; CH Ar); 6,12 (m; 1 H; CH Ar); 5,34 (s; 3 H; OH); 3,74 (s; 6 H; CH_3O); 3,61 - 3,49 (m; 20 H; CH_2); 2,31 (s; 2 H; CH_2).

^{13}C NMR (63 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 157,73; 157,13; 153,54; 150,85; 140,71; 137,94; 130,97; 130,49; 120,2; 118,26; 103,63; 70,23; 63,11; 56,31; 55,71; 52,51; 7,66.

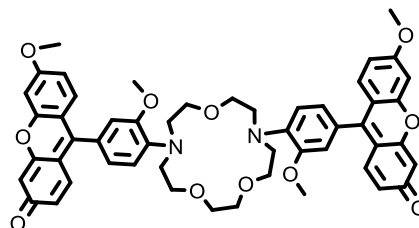
Synthesevorschrift für 9,9'-((1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7,13-diyl)bis(3-methoxy-4,1-phenylen))bis(6-methoxy-3H-xanthen-3-on) (**14**)

Zur Generierung des Diazomethans wurde eine Mini Diazald® Apparatur von SIGMA-ALDRICH mit geglätteten Schliffen verwendet. Im Sumpf wurden 2,5 g KOH, gelöst in 4 ml Wasser und 12 ml Ethanol, mit 5 g Diazald, gelöst in 40 ml Ether, überschichtet und auf 65 – 70 °C erhitzt. Die Vorlage wurde mit Isopropanol/Trockeneis gekühlt, in dieser kondensiert nach und nach das Diazomethan, gelöst in Ether, als intensiv gelbe Lösung.

In einem 50 ml Rundkolben wurden 30 mg (35 µmol) 9,9'-((1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7,13-diyl)bis(3-methoxy-4,1-phenylen))bis(6-hydroxy-3H-xanthen-3-on) **12** in trockenem Ether suspendiert und mit einem großen Überschuss an Diazomethan in Ether versetzt. Nachdem die Gasentwicklung beendet war, wurde nochmals eine kleine Menge Diazomethan in Ether zugegeben, 30 min gerührt und überschüssiges Diazomethan mit Essigsäure umgesetzt. Nachdem die Gasentwicklung beendet war, wurde komplett eingengt und getrocknet. Die Reinigung erfolgte über präparative Dünnschichtchromatographie mit CHCl₃/MeOH (10:1) als Eluent. Die Detektion des Produktes erfolgte über MS. Die Reinigung von **14** blieb unvollständig.

Summenformel: C₅₂H₅₀N₂O₁₁,
Molmasse: 878,96 g/mol.

Ausbeute: 19 mg (60 % Ausbeute), brauner harziger Feststoff.



MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 879 (100) [M+H⁺].

HR-MS (Micro-ESI pos., [M+H⁺]) C₅₂H₅₁N₂O₁₁ ber.: 879,34928; gem.: 879,34883.

Synthesevorschrift für 9-(4-(13-(4-(2,4-dimethoxybenzyl)-2-methoxyphenyl)-1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7-yl)-3-methoxyphenyl)-6-methoxy-3H-xanthen-3-on (**15**)

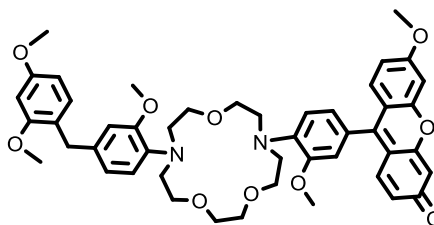
In einem 50 ml Rundkolben wurden 30 mg (39 µmol) 9-(4-(13-(4-(2,4-dihydroxybenzyl)-2-methoxyphenyl)-1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7-yl)-3-methoxyphenyl)-6-hydroxy-3H-xanthen-3-on **13** in 10 ml trockenem DMF gelöst, mit 8,6 µl (138 µmol) MeI und 19 mg (138 µmol) K₂CO₃ versetzt und 72 h bei RT gerührt.

Experimenteller Teil

Da das einfach methylierte Produkt (MS: 799 (100) $[M+Na^+]$) entstand, wurde mit einem Überschuss an MeI (17 μ l MeI, 40 mg K_2CO_3) über Nacht bei RT gerührt. Nach Wasserzugabe wurde die Wasserphase 4-mal mit DCM extrahiert und anschließend die DCM Phase 5-mal mit Wasser gewaschen, um DMF zu entfernen. Das Rohprodukt wurde über präparative Dünnschichtchromatographie mit $CHCl_3/MeOH$ (10:1) als Eluent gereinigt. Es schloss sich eine zweite präparative Dünnschichtchromatographie mit dem gleichen Eluenten an. Die Reinigung blieb unvollständig.

Summenformel: $C_{47}H_{52}N_2O_{10}$,
Molmasse: 804,94 g/mol.

Ausbeute: 9 mg (29 % Ausbeute), brauner harziger Feststoff.



MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 827,6 (75) $[M+Na^+]$; 869,5 (100).

HR-MS (Micro-ESI pos., $[M+Na^+]$) $C_{47}H_{52}NaN_2O_{10}$ ber.: 827,35196; gem.: 827,35184.

Alkylierung von **12** und **13** mit *tert*-Butylbromacetat

In einem 50 ml Rundkolben wurden 50 mg (65 μ mol) **13**, 27 mg K_2CO_3 (197 μ mol) und 23 mg NaI (151 μ mol) in 10 ml trockenem MeCN vorgelegt und mit 39 μ l (260 μ mol, 51 mg) *tert*-Butylbromacetat versetzt. Die Suspension wurde 16 h unter Rückfluss gerührt, mit 42 μ l *tert*-Butylbromacetat, 30 mg K_2CO_3 , 23 mg NaI und 5 ml trockenem MeCN versetzt und weitere 24 h unter Rückfluss gerührt.

In einem 50 ml Rundkolben wurden 55 mg (65 μ mol) **12**, 20 mg K_2CO_3 (142 μ mol) und 10 mg NaI (67 μ mol) in 10 ml trockenem MeCN vorgelegt und mit 21 μ l (142 μ mol) *tert*-Butylbromacetat versetzt. Die Suspension wurde 16 h bei 75 °C gerührt, mit 10 μ l *tert*-Butylbromacetat und 5 ml trockenem MeCN versetzt und weitere 8 h bei 75 °C gerührt.

Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung komplett eingeeengt, der Rückstand in DCM aufgenommen und über eine kleine G4 Fritte filtriert. Das Filtrat wurde vollständig eingeeengt und getrocknet. Anschließend wurde das Rohprodukt in DCM gelöst, auf eine präparative DC-Platte aufgetragen, kurz mit $CHCl_3/MeOH$ (1:1) und anschließend mit $CHCl_3/MeOH$ (10:1) eluiert. Die verschiedenen Banden (eine Haupt-

Experimenteller Teil

und 2 – 3 Nebenbanden) wurden abgetrennt, das Produkt mit MS detektiert und mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) und etwas TEA extrahiert.

Di-tert-butyl 2,2'-(((4-(4-(13-(4-(6-(2-(tert-butoxy)-2-oxoethoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-2-methoxyphenyl)-1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7-yl)-3-methoxybenzyl)-1,3-phenylen)bis(oxy))diacetat (16)

Summenformel: $\text{C}_{62}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{16}$,
Molmasse: 1105,29 g/mol.

Ausbeute: 34 mg (50 %), rot-brauner harziger Feststoff.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 1105 (10) $[\text{M}+\text{H}^+]$; 1127,1 (100) $[\text{M}+\text{Na}^+]$.

HR-MS (Micro-ESI pos., $[\text{M}+\text{Na}^+]$) $\text{C}_{62}\text{H}_{76}\text{NaN}_2\text{O}_{16}$ ber.: 1127,50925; gem.: 1127,51007.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7,29 (m; 3 H; CH Ar); 7,11 (m; 3 H; CH Ar); 6,94 (m; 5 H; CH Ar); 6,64 (m; 3 H; CH Ar); 6,39 (m; 1 H; CH Ar); 4,53 (m; 6 H; CH_2); 3,64 (m; 28 H; CH_2); 1,48 (m; 27 H; CH_3).

Di-tert-butyl-2,2'-((((1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7,13-diyl)bis(3-methoxy-4,1-phenylen))bis(3-oxo-3H-xanthen-9,6-diyl))bis(oxy))diacetat (18)

Summenformel: $\text{C}_{62}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{O}_{15}$,
Molmasse: 1079,21 g/mol.

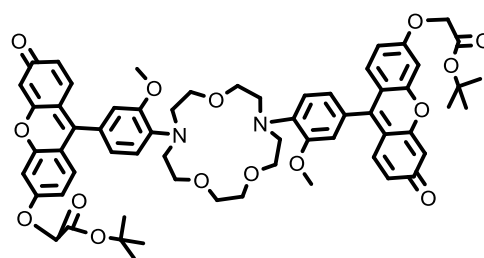
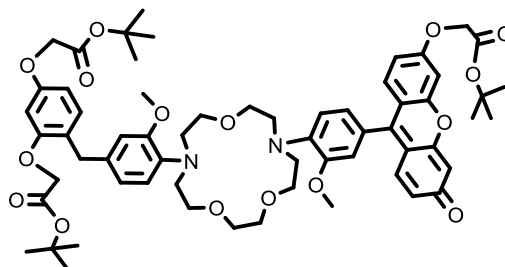
Ausbeute: 60 %, rot-brauner harziger Feststoff.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 1101,2 (100) $[\text{M}+\text{Na}^+]$.

HR-MS (Micro-ESI pos., $[\text{M}+\text{Na}^+]$) $\text{C}_{62}\text{H}_{66}\text{NaN}_2\text{O}_{15}$ ber.: 1101,43608; gem.: 1101,43678.

Spaltung der tert-Butylester von 16 und 18

In einem 50 ml Rundkolben wurden 30 μmol des entsprechenden *tert*-Butylesters in 10 ml DCM vorgelegt, mit 5 ml TFA und 5 Tropfen H_2O versetzt und 16 h bei RT gerührt. Das resultierende Rohprodukt ließ sich nicht vollständig einengen und wurde über Nacht in einer Petrischale getrocknet. Der entstandene grüne Film wurde in MeCN



Experimenteller Teil

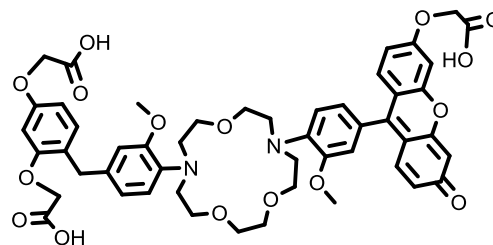
und etwas MeOH gelöst, auf eine präparative RP18-DC-Platte aufgetragen, kurz mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) und anschließend mit $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (1:1) und 1 % TFA eluiert.

2,2'-((4-(4-(13-(4-(6-(carboxymethoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-2-methoxyphenyl)-1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7-yl)-3-methoxybenzyl)-1,3-phenylene)bis(oxy))diessigsäure (17)

Summenformel: $\text{C}_{50}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{16}$,
Molmasse: 936,96 g/mol.

Ausbeute: 9 mg (15 %), grüner harziger Feststoff.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 936,9 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]$.



HR-MS (Micro-ESI pos., $[\text{M}+\text{H}^+]$) $\text{C}_{50}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_{16}$ ber.: 937,33950; gem.: 937,33897.

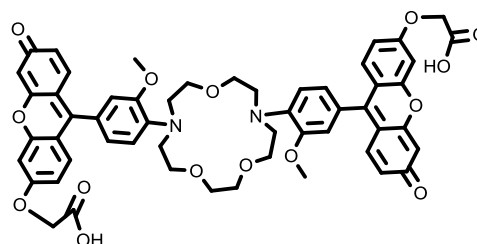
^1H NMR (250 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7,24 (m; 3 H; CH Ar); 7,04 (m; 2 H; CH Ar); 6,84 (m; 4 H; CH Ar); 6,72 (m; 3 H; CH Ar); 6,43 (m; 1 H; CH Ar); 6,38 (m; 1 H; CH Ar); 6,21 (m; 1 H; CH Ar); 5,38 (m; 6 H; CH_2); 3,74 (m; 6 H; CH_3); 3,68 (m; 22 H; CH_2).

2,2'-((((1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7,13-diyl)bis(3-methoxy-4,1-phenylen))bis(3-oxo-3H-xanthen-9,6-diyl))bis(oxy))diessigsäure (19)

Summenformel: $\text{C}_{54}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_{15}$,
Molmasse: 966,99 g/mol.

Ausbeute: 18 %, gelbbrauner amorpher Feststoff.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 968,1 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]$.



5.2.3 Synthese von Ionophor-7-Syrylderivaten

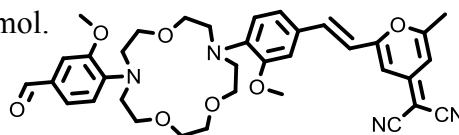
Reaktion von Ionophor 7 mit CH-aziden Verbindungen

In einem 50 ml Rundkolben wurden 100 mg (206 μmol) 4,4'-(1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7,13-diyl)bis(3-methoxybenzaldehyd) **7** und 206 μmol der entsprechenden CH-aziden Verbindung in 20 ml trockenem MeCN gelöst, mit 5 Tropfen Piperidin versetzt und für 16 h bei 80 °C gerührt. Nach dem Erkalten wurde komplett eingeeengt und getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte anschließend über eine Säulenchromatographie mit Kieselgel 60. Eluent war DCM mit einem langsam steigenden Essigesteranteil. Es folgte eine präparative Dünnschichtchromatographie mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (10:1) als Eluent.

(E)-2-(2-(4-(13-(4-formyl-2-methoxyphenyl)-1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7-yl)-3-methoxystyryl)-6-methyl-4H-pyran-4-yliden)malononitril (**23**)

Summenformel: $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_7$, Molmasse: 640,74 g/mol.

Ausbeute: 19 mg (14 % Ausbeute), roter harziger Feststoff.



MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 663 (100) $[\text{M}+\text{Na}^+]$.

HR-MS (Micro-ESI pos., $[\text{M}+\text{Na}^+]$) $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{NaN}_4\text{O}_7$ ber.: 663,27946; gem.: 663,27872.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 9,78 (s; 1 H; CHO); 7,35 (m; 4 H; CH); 6,94 (m; 4 H; CH); 6,65 (m; 2 H; CH); 3,86 (s; 6 H; CH_3O); 3,64 (m; 20 H; CH_2); 2,41 (s; 3 H; CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 190,53 (CHO); 161,91 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 158,63 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 156,4 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 151,03 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 129,53 (CH); 126,84 (CH); 122,59 (CH); 121,11 (CH); 114,56 (CH); 109,89 (CH); 106,34 (CH); 70,88 (CH_2); 69,52 (CH_2); 69,09 (CH_2); 61,48 (CH_2); 55,59 (CH_3); 53,55 (CH_2); 52,45 (CH_2); 19,98 (CH_3).

4-(4-(13-(4-formyl-2-methoxyphenyl)-1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7-yl)-3-methoxystyryl)-1-methylpyridinium (**21**)

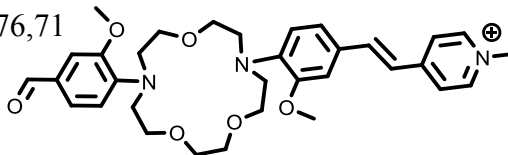
Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte über eine Säulenchromatographie mit neutralem Aluminiumoxid. Eluent war DCM mit einem langsam steigenden Methanolanteil. Das so erhaltene Produkt erschien rein und es konnten MS und HR-MS gemessen werden. Jedoch konnten das ^1H - und ^{13}C -Spektrum sowie die 2D-Spektren

Experimenteller Teil

nicht ausgewertet werden, darum folgte eine präparative Dünnschichtchromatographie mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) als Eluent. Wie erwartet konnte das fluoreszierende Produkt abgetrennt werden, jedoch verblieb nach der Extraktion nur sehr wenig eines nichteinheitlichen fluoreszierenden Produktes.

Summenformel: $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_6^+$, Molmasse: 576,71 g/mol.

Ausbeute: wenige mg, roter harziger Feststoff.



MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 576,2 (100) $[\text{M}^+]$.

HR-MS (Micro-ESI pos., $[\text{M}^+]$) $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_6^+$ ber.: 576,30736; gem.: 576,3091.

5.3 Synthese der [2.1.1]-basierenden Natriumionenindikatoren

5.3.1 Synthese der Diaza-[15]Krone-5-Derivate

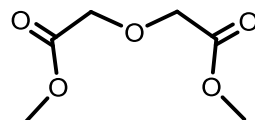
Synthesevorschrift für die Dicarbonsäuredimethylester

In einem 100 ml Rundkolben wurden 0,059 mol Dicarbonsäure in 45 ml trockenem Methanol unter Rühren gelöst und auf einem Eisbad gekühlt. Über einen Tropftrichter mit Druckausgleich erfolgte innerhalb von 10 min die Zugabe von 10 ml (16,4 g, 137 mmol) Thionylchlorid. Die Reaktionsmischung rührte 16 h bei Raumtemperatur, dann wurden 1,5 ml Thionylchlorid zugegeben und weitere 4 h bei 50 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit wenig MeOH gewaschen. Das Filtrat wurde eingeeengt und der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit wenig MeOH gewaschen.

Glykolsäuredimethylester (9)

Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$, Molmasse: 162,14 g/mol.

Ausbeute: 50 %, weißer Feststoff.



^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4,13 (s; 2 H; CH_2); 3,65 (s; 3 H; CH_3).

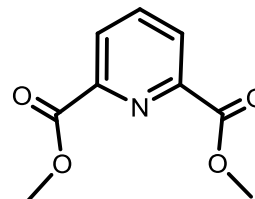
^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 174,74 (COO); 72,71 (CH_2); 56,6 (CH_3).

Dipicolinsäuredimethylester (12)

Summenformel: $C_9H_9NO_4$, Molmasse: 195,17 g/mol.

Ausbeute: 89 %, weißer Feststoff.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8,32 (d, J = 8 Hz, 2H, CH); 8,02 (t, J = 7,75 Hz, 1H, CH); 4,02 (s, 6H, CH_3).



^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 165,03 ($C_{quart.}$); 148,22 ($C_{quart.}$); 138,34 (CH Ar); 128,01 (CH Ar); 53,37 (CH_3).

Synthesevorschrift für 1,4,10-trioxa-7,13-diazazyklopentadecan-8,12-dion (33)

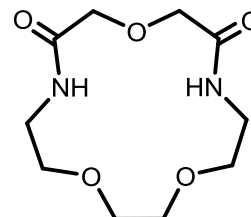
In einem 1000 ml Rundkolben wurden 10,47 g (0,065 mol) Glykolsäuredimethylester **9**, 9,9 ml (0,065 mol, 9,63 g) 2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethanamin und 11,4 ml (0,065 mol) 30 %iges MeONa in 500 ml MeOH gelöst, kurz geschüttelt und 48 h stehen gelassen. Das Methanol wurde komplett entfernt und das verbliebene Öl wurde mit 1 N Schwefelsäure behandelt bis eine klare Lösung entstand. Diese wurde 5-mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit Natriumsulfat getrocknet, komplett eingeeengt und getrocknet.

Summenformel: $C_{10}H_{18}N_2O_5$, Molmasse: 246,26 g/mol.

Ausbeute: 12,9 g (80 %), weißer Feststoff.

MS (DEI) m/z (%): 247 (100) $[M+1]$.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7,07 (s, 2H, NH Amid); 4,03 (s, 4 H, CH_2); 3,5 (m, 12 H, CH_2).



^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 167,73 (C Amid); 70,02 (CH_2); 68,54 (CH_2); 38,3 (CH_2).

Synthesevorschrift für 6,9-dioxa-3,12-diaza-1(2,6)-pyridinacyclotridecaphan-2,13-dion (13)

In einem 250 ml Rundkolben wurden 3,8 g (19,5 mmol) Dipicolinsäuredimethylester **12**, 2,98 ml (19,5 mmol, 2,88 g) 2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethanamin in 120 ml trockenem MeOH und 30 ml trockenem DCM gelöst, kurz geschüttelt und 7 d bei RT gerührt. Das Methanol wurde komplett entfernt und das verbliebene Öl über Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 und DCM/MeOH (20:1) gereinigt.

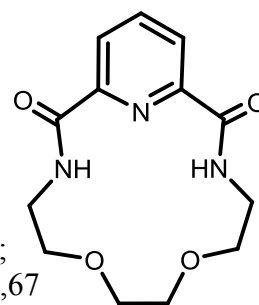
Summenformel: $C_{13}H_{17}N_3O_4$, Molmasse: 279,29 g/mol.

Ausbeute: 3,3 g (60 %), weißer Feststoff.

MS (Micro-ESI) m/z (%): 302,1 (100) $[M+Na^+]$.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8,83 (s, 2 H, NH Amid); 8,26 (d, $J = 7,75$ Hz, 2 H, CH); 8,02 (t, $J = 7,75$ Hz, 1 H, CH); 3,67 (m, 12 H, CH_2).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 162,68 ($C_{quart.}$); 148,23 ($C_{quart.}$); 139,35 (CH Ar); 123,76 (CH Ar); 70,71 (CH_2); 68,55 (CH_2); 38,78 (CH_2).



Hydrierung der Diaza-[15]Krone-5-Derivate

Variante A: Hydrierung mit $LiAlH_4$

In einem 500 ml Zweihalskolben wurden 9,2 g (0,24 mol) $LiAlH_4$ in 200 ml trockenem THF unter Stickstoff vorgelegt. Bei 0 °C erfolgte langsam die Zugabe von 0,052 mol Diaza-[15]Krone-5-Derivat als Feststoff. Es wurde noch eine halbe Stunde bei 0 °C gerührt und anschließend über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 20 ml Wasser in 50 ml THF, 20 ml 15 % NaOH und 20 ml Wasser in 20 ml THF zugegeben. Der entstandene Feststoff wurde abgesaugt und dreimal mit 20 ml Toluol gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt, eingeeengt und getrocknet. Das entstandene gelbe Öl wurde durch Heißeextraktion mit Heptan gereinigt.

Variante B: Hydrierung mit BH_3-Me_2S

In einem 50 ml Zweihalskolben wurden 3,6 mmol Diaza-[15]Krone-5-Derivat in 10 ml trockenem THF unter Stickstoff vorgelegt. Bei 0 °C erfolgte langsam die Zugabe von 6,6 ml (13,2 mmol) 2 M BH_3-Me_2S -Lösung in THF. Es wurde eine halbe Stunde bei

Experimenteller Teil

0 °C und anschließend über Nacht bei 40 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 1 ml MeOH und nach einigem Rühren 3 ml 1 M HCl zugegeben, dann wurde komplett eingengt. Zur Entfernung des Dimethylsulfides wurde MeOH (10 ml) zugegeben, eingengt und das ganze 4-mal wiederholt und dann komplett eingengt. Das verbliebene Harz wurde in verdünnter HCl und DCM aufgenommen, die DCM-Phase entfernt, die Wasserphase mit KOH auf pH 11 - 12 eingestellt und 6-mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten DCM-Phasen wurden über K₂CO₃ getrocknet, filtriert, eingengt und getrocknet.

1,4,10-trioxa-7,13-diazacyklopentadecan (37)

Synthese nach Variante A und Variante B möglich.

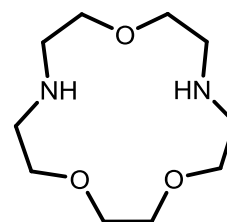
Summenformel: C₁₀H₂₂N₂O₃, Molmasse: 218,29 g/mol.

Ausbeute: 72 %, weißer Feststoff.

MS (Micro-ESI) m/z (%): 219,3 (100) [M+H⁺].

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3,6 (m, 12 H, CH₂); 2,77 (m, 8 H, CH₂); 2,66 (s, 2H, NH Amin).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 77,52 (CH₂); 77,01 (CH₂); 76,5 (CH₂); 69,9 (CH₂); 69,65 (CH₂); 69,23 (CH₂); 49,04 (CH₂); 48,82 (CH₂).



6,9-dioxa-3,12-diaza-1(2,6)-pyridinacyclotridecaphan (14)

Synthese nach Variante B.

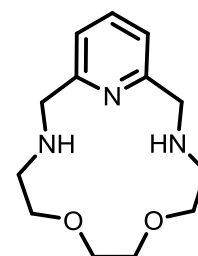
Summenformel: C₁₃H₂₁N₃O₂, Molmasse: 251,33 g/mol.

Ausbeute: 55 %, weißer Feststoff.

MS (Micro-ESI) m/z (%): 252,2 (100) [M+H⁺].

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,54 (m, 1 H, CH Ar); 7 (m, 2 H, CH Ar); 3,92 (s, 4 H, CH₂); 3,65 (m, 12 H, CH₂); 3,2 (s, 2 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 157,38 (C_{quart.}); 137,38 (CH Ar); 120,21 (CH Ar); 69,8 (CH₂); 53,45 (CH₂); 49,08 (CH₂).



5.3.2 Synthese einer [2.1.1]-Struktur mit funktioneller Gruppe

Synthesevorschrift für N,N-Diessigsäure-*tert*-butylester-phenylamin (30)

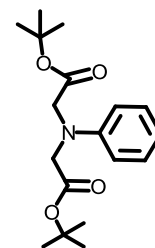
Experimenteller Teil

In einem 250 ml Rundkolben wurden 4,5 ml (0,0493 mol) Anilin und 14,88 ml (19,79 g, 0,1015 mol) Bromessigsäure-*tert*-butylester in 110 ml Acetonitril vorgelegt, mit 3 g (0,02 mol) Natriumiodid und 13,8 g (0,1 mol) K₂CO₃ versetzt und über Nacht unter Rückfluss gerührt. Nach dem Abkühlen und Abziehen des Lösungsmittels wurde in DCM aufgenommen, filtriert und der Feststoff 3-mal mit DCM gewaschen. Die vereinigten Extrakte wurden 2-mal mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, komplett eingengt und getrocknet. Produkt **30** musste zügig weiter umgesetzt werden, da es immer dunkler wurde und sich zersetzte.

Summenformel: C₁₈H₂₇NO₄ Molmasse: 321,41 g/mol.

Ausbeute: 15,5 g (95 – 100 %), braunes Öl.

MS (DEI) m/z (%): 321 (35) [M⁺].



¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,22 (t; J = 7,2; 2 H, CH Ar); 6,77 (t; J = 7,6; 1 H, CH Ar); 6,62 (d; J = 8,4; 2 H, CH Ar); 4,03 (s, 4 H, CH₂); 1,48 (s, 18 H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 169,52 (C COO); 145,75 (C_{quart.}); 129,14 (C_{quart.}); 117,89 (CH Ar); 112,34 (CH Ar); 81,61 (C_{quart.}); 54,53 (CH₂); 28,1 (CH₃).

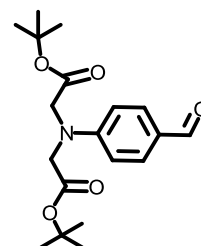
Synthesevorschrift für N,N-Diessigsäure-*tert*-butylester-4-aminobenzaldehyd (**31**)

In einem 50 ml Rundkolben wurden 7 g (0,022 mol) N,N-Diessigsäure-*tert*-butylester-phenylamin **30** in 9 ml (0,035 mol) trockenem DMF gelöst, unter Rühren und Eiskühlung wurden langsam 2,8 ml POCl₃ zugetropft, anschließend wurde bei Raumtemperatur 16 h gerührt. Die braune Reaktionsmischung wurde mit 20 ml trockenem DCM verdünnt und unter starkem Rühren auf 100 ml 2 N NaOH gegossen. Es trat eine starke Hitzeentwicklung auf. Nach dem Abkühlen wurde die wässrige Phase zweimal mit DCM extrahiert und die vereinigten Extrakte komplett eingengt. Das entstandene Öl wurde in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, um Reste an DMF zu entfernen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgezogen und das Rohprodukt getrocknet.

Summenformel: C₁₉H₂₇NO₅ Molmasse: 349,42 g/mol.

Ausbeute: 5,9 g (78 %), hellbraunes Öl, kristallisiert langsam aus.

MS (DEI) m/z (%): 350 (20) [M⁺].



Experimenteller Teil

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 9,75 (s; 1 H; CHO); 7,74 (d; J = 8,8; 2 H; CH Ar); 6,63 (s; J = 8; 2 H; CH Ar); 4,05 (s; 4 H; CH_2); 1,42 (s; 18 H; CH_3).

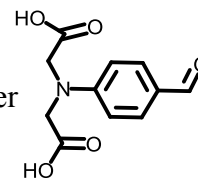
^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 190,44 (CHO); 168,92 (C COO); 152,79 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 131,95 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 127,01 (CH Ar); 111,58 (CH Ar); 82,42 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 54,34 (CH_2); 28,02 (CH_3).

Synthesevorschrift für 4-Formylphenylaminodiessigsäure (32)

In einem 50 ml Rundkolben wurden 4 g (0,011 mol) N,N-Diessigsäure-*tert*-butylester-4-aminobenzaldehyd **31** in 5 ml Chloroform vorgelegt und unter Rühren und Eiskühlung mit 5 ml TFA versetzt. Dann wurde 2 h bei RT gerührt und der entstandene Feststoff abgesaugt. Dieser wurde 3-mal mit DCM gewaschen um einen weißen bis hellgelben Feststoff zu erhalten. Im Filtrat fiel nach einiger Zeit weiteres Produkt aus, welches auf die gleiche Art gereinigt wurde. Dies konnte insgesamt 1 - 2-mal wiederholt werden, um maximale Ausbeuten zu erreichen.

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_5$ Molmasse: 237,21 g/mol.

Ausbeute: 2,33 g (86 %), weißer Feststoff, der sich schnell gelb oder grün verfärbte.



MS (DEI) m/z (%): 237 (60) [M^+].

^1H NMR (250 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 9,69 (s; 1 H; CHO); 7,71 (d; J = 10; 2 H; CH Ar); 6,68 (s; J = 7,5; 2 H; CH Ar); 4,22 (s; 4 H; CH_2).

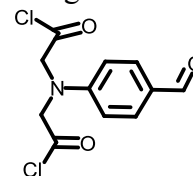
^{13}C NMR (63 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 190,65 (CHO); 171,71 (COOH); 153,3 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 131,92 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 126,29 (CH Ar); 111,86 (CH Ar); 53,14 (CH_2).

Synthesevorschrift für 4-Formylphenylaminodiazetylchlorid (**33**)

In einem 50 ml Rundkolben wurde 1 g (4,22 mmol) 4-Formylphenyl-aminodiessigsäure **32** in 20 ml trockenem Dioxan vorgelegt, mit 4 Tropfen Pyridin und 1,2 ml (16,5 mmol) SOCl_2 versetzt und 2 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde komplett eingeeengt und getrocknet. Das entstandene dunkle Öl wurde sofort weiter umgesetzt.

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_3$ Molmasse: 274,1 g/mol.

Ausbeute: 1,1 g (98 %), dunkelbraunes Öl oder Harz.



Synthesevorschrift für 4-(16,20-dioxo-4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)benzaldehyd (**34**)

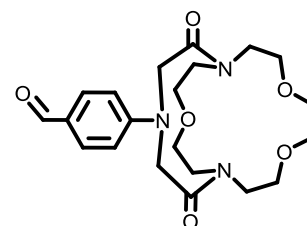
In einem getrockneten und ausgeheizten 500 ml Rundkolben wurden 1,15 g (4,21 mmol) 4-Formylphenylaminodiazetylchlorid **33** in 120 ml trockenem DCM gelöst und unter starkem Rühren mit 0,92 g (4,2 mmol) 1,4,10-trioxa-7,13-diazazyklopentadecan **37**, gelöst in 100 ml trockenem DCM, versetzt. Nach der Zugabe von 2,3 ml (16,8 mmol) trockenem Triethylamin wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde komplett eingeeengt, wieder in 60 ml DCM aufgenommen, 3-mal mit 2 N HCl und einmal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel wurde entfernt und die braune harzige Substanz wurde getrocknet. Das Harz musste langsam und vorsichtig getrocknet werden, da es explosionsartig aufschäumte und erstarrte. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 und $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (20:1 – 10:1), als Eluent gereinigt. Eine Probe wurde über präparative DC mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (10:1) gereinigt. Ein Teil dieser Probe kristallisierte nach einigen Monaten aus einer DCM-MeOH-Aceton Mischung aus.

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$ Molmasse: 419,47 g/mol.

Ausbeute: 0,53 g (30 %), gelbbrauner amorpher Feststoff.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 442,2 (100) $[\text{M}+\text{Na}^+]$; 861,5 (60) $[2\text{M}+\text{Na}^+]$.

HR-MS (Micro-ESI pos., $[\text{M}+\text{Na}^+]$) $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NaN}_3\text{O}_6$ ber.: 442,19540; gem.: 442,19603.



Experimenteller Teil

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃ + D-TFA): δ (ppm) = 9,43 (s; 1 H; CHO); 7,76 (d; J = 10; 2 H; CH Ar); 7,03 (s; J = 7,5; 2 H; CH Ar); 4,79 (m; 2 H; CH₂); 4,53 (m; 2 H; CH₂); 4,37 (m; 2 H; CH₂); 4,2 (m; 2 H; CH₂); 3,94 (m; 4 H; CH₂); 3,69 (m; 6 H; CH₂); 3,43 (m; 2 H; CH₂); 3,18 (m; 2 H; CH₂); 2,91 (m; 2 H; CH₂).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃ + D-TFA): δ (ppm) = 192,53 (CHO); 171,39 (COOH); 159,52 (C_{quart.}); 158,86 (C_{quart.}); 156,15 (CH Ar); 133,76 (CH Ar); 124,66 (CH₂); 121,44 (CH₂); 116,89 (CH₂); 112,93 (CH₂); 112,36 (CH₂); 107,81 (CH₂); 68,43 (CH₂); 67,93 (CH₂); 66,57 (CH₂); 52,22 (CH₂); 50,86 (CH₂).

RKSA: fo5709.

5.3.3 Hydrierung des [2.1.1]-Derivats 34

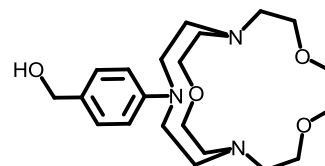
Synthesevorschrift für (4-(4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)phenyl)methanol (39)

In einem ausgeheizten 50 ml Rundkolben mit Septum wurden 100 mg (0,24 mmol) 4-(16,20-dioxo-4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)benzaldehyd **34** gelöst in 10 ml trockenem DCM vorgelegt und einige Zeit auf Eis unter N₂ gerührt. Es wurden anschließend 0,8 ml (1,36 mmol) 1,7 M DIBAL-Lösung in Toluol langsam zugetropft und insgesamt 60 min gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde 1 ml Isopropanol/Wasser (1/1) zugegeben und die gesamte Mischung 10 min gerührt und anschließend auf Eis gegossen. Es wurde mit DCM extrahiert, anschließend die Wasserphase mit Cs₂CO₃ versetzt und noch 3-mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit K₂CO₃ getrocknet, komplett eingengt und getrocknet. Es erfolgte keine Isolierung. Das Rohprodukt wurde weiter umgesetzt.

Summenformel: C₂₁H₃₅N₃O₄, Molmasse: 393,52 g/mol.

Ausbeute: braunes Harz.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 394,2 (100) [M+Na⁺].



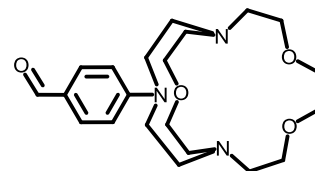
Synthesevorschrift für 4-(4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)benzaldehyd (**40**)

In einem ausgeheizten 50 ml Rundkolben wurden 80 mg (0,2 mmol) 4-(4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)phenyl)methanol **39** in 7 ml trockenem DCM gelöst und unter Rühren mit 0,1 ml (1,2 mmol) Pyridin und 131 mg (0,3 mmol) Dess-Martin-Periodan, gelöst in 8 ml trockenem DCM, versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Cs₂CO₃-Lösung versetzt, einige Zeit gerührt und mit Ethylacetat extrahiert. Trat nach dem Schütteln keine Phasentrennung auf, konnte mit CsCl die Phasentrennung verbessert werden. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden über K₂CO₃ getrocknet, eingeeengt und getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Kieselgel 60 gereinigt. Eluent war DCM mit einem zunehmenden Anteil an MeOH und später MeOH/Essigsäure (1:1).

Summenformel: C₂₁H₃₃N₃O₄ Molmasse: 391,5 g/mol.

Ausbeute: 11 mg (12 %, bezogen auf **34**), braunes Harz.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 392,2 (100) [M+Na⁺].



HR-MS (Micro-ESI pos., [M+H⁺]) C₂₁H₃₄N₃O₄ ber.: 392,25493; gem.: 392,25437.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃ + D-TFA): δ (ppm) = 9,72 (s; 1 H; CHO); 7,98 (m; 4 H; CH Ar); 7,75 (m; 2 H; CH₂); 7,4 (m; 2 H; CH₂); 7,15 (m; 2 H; CH₂); 6,77 (m; 2 H; CH₂); 3,63 (m; 20 H; CH₂).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃ + D-TFA): δ (ppm) = 190,5 (CHO); 168,9 (C_{quart.}); 141,45 (C_{quart.}); 134,67 (CH Ar); 132,81 (CH Ar); 131,49 (CH₂); 127,99 (CH₂); 94,4 (CH₂); 69,77 (CH₂); 68,88 (CH₂).

5.3.4 Synthese der [2.1.1]-Fluoreszenzfarbstoff-Strukturen

Synthesevorschrift für 9-(4-(4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)phenyl)-6-hydroxy-3H-xanthen-3-on (**42**)

In einem 5 ml Rundkolben wurden 72 mg (184 μmol) 4-(4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)benzaldehyd **40** und 47 mg (427 μmol) Resorcinol in 1 ml MeSO₃H gelöst und bei 75 °C 16 h gerührt. Nach dem Abkühlen wurde auf 5 ml vollentsalztes Wasser gegossen und der pH-Wert mit Cs₂CO₃ auf 7 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert, mit Wasser gewaschen, getrocknet, in

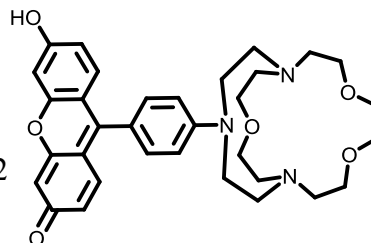
Experimenteller Teil

CHCl₃/MeOH (1:1) gelöst, erneut filtriert und anschließend eingengt und getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit RP-18 Kieselgel gereinigt. Mit H₂O/MeOH (2:1) + 1 % TFA wurde zu Beginn eluiert und der Methanolanteil langsam erhöht.

Summenformel: C₃₃H₃₉N₃O₆, Molmasse: 573,69 g/mol.

Ausbeute: 5 mg (5 %), brauner harziger Feststoff.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 597 (12) [M+Na⁺]; 574,2 (100) [M+H⁺].



HR-MS (Micro-ESI pos., [M+H⁺]) C₃₃H₄₀N₃O₆ ber.: 574,2917; gem.: 574,2932.

¹H NMR (600 MHz, D-MeOH + D-TFA): δ (ppm) = 7,88 (m; 1 H; CH Ar); 7,86 (m; 1 H; CH Ar); 7,83 (m; 2 H; CH Ar); 7,66 (m; 1 H; CH Ar); 7,44 (s; 2 H; CH Ar); 7,3 (m; 4 H; CH Ar); 4,05 – 3,2 (m; 28 H; CH₂).

Synthese der 40-Styrylfarbstoff-Derivate

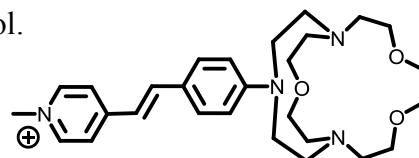
In einem 50 ml Rundkolben wurden 27 mg (69 μmol) 4-(4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)benzaldehyd **40** und 85 μmol der entsprechenden CH-aziden Verbindung in 10 ml trockenem MeCN vorgelegt und mit 4 Tropfen Piperidin versetzt. Die Reaktion wurde bei 80 °C 5 - 16 h gerührt, bis auf der DC kein Derivat **40** mehr zu sehen war. Nach dem Erkalten wurde komplett eingengt und getrocknet.

4-(4-(4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)styryl)-1-methylpyridiniumiodid (**43**)

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit neutralem Aluminiumoxid gereinigt. Eluent war MeCN mit steigendem MeOH-Anteil.

Summenformel: C₂₈H₄₁N₄O₃⁺, Molmasse: 481,66 g/mol.

Ausbeute: 14 mg (33 %), rotes Harz.



MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 481,2 (100) [M⁺].

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ (ppm) = 8,72 (m; 3 H; CH); 8,35 (m; 2 H; CH); 7,92 (m; 3 H; CH); 7,57 (m; 2 H; CH); 4,3 (m; 6 H; CH₂); 3,62 (m; 16 H; CH Ar); 3,16 (m; 6 H; CH₂); 1,87 (m; 3 H; CH₃).

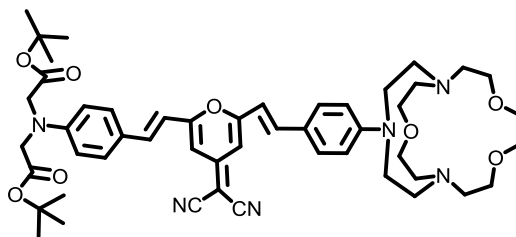
Synthesevorschrift für di-*tert*-butyl 2,2'-((4-((*E*)-2-(6-((*E*)-4-(4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)styryl)-4-(dicyanomethylen)-4H-pyran-2-yl)vinyl)phenyl)azanediyl)diacetat (45)

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit neutralem Aluminiumoxid gereinigt. Eluent war DCM mit steigendem Essigesteranteil.

Summenformel: C₅₀H₆₄N₆O₈,
Molmasse: 877,08 g/mol.

Ausbeute: 3 mg (6 %), rot-braunes Harz.

MS (Micro-ESI pos.) *m/z* (%): 877,4 (100) [M+H⁺]; 900,2 (40) [M+Na⁺].



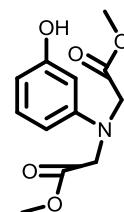
Synthesevorschrift für N,N-Diessigsäure-*tert*-butylester-(3-hydroxy-phenyl)amin (55)

In einem 250 ml Rundkolben wurden 5 g (0,046 mol) 3-Aminophenol und 8,6 ml (14,2 g, 0,093 mol) Bromessigsäure-*tert*-butylester in 80 ml Acetonitril vorgelegt, mit 3 g (0,02 mol) Natriumiodid und 13,1 g (0,1 mol) Na₂HPO₄ (0,092 mol) versetzt und 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung mit Wasser versetzt, bis eine Phasentrennung entstand. Die MeCN-Phase wurde abgetrennt und die Wasser-Phase 3-mal mit Toluol extrahiert. Nach dem Einengen der vereinigten organischen Phasen verblieb ein braunes Öl. Dieses wurde durch Extraktion mit heißem Toluol gereinigt.

Summenformel: C₂₁H₂₉N₃O₆ Molmasse: 419,47 g/mol.

Ausbeute: 8,8 g (75 %), gelbes Öl.

MS (DEI) *m/z* (%): 253 (100) [M⁺].



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7,64 (m; 1 H; OH Ar); 7,41 (m; 1 H; CH Ar); 6,65 (m; 1 H; CH Ar); 6,54 (m; 2 H; CH Ar); 4,49 (s; 4 H; CH₂); 4,12 (s; 6 H; CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171,93 (COO); 149,56 (C_{quart.}); 130,65 (C_{quart.}); 106,09 (CH Ar); 100,32 (CH Ar); 53,71 (CH₂); 52,61 (CH₂); 31,32 (CH₃).

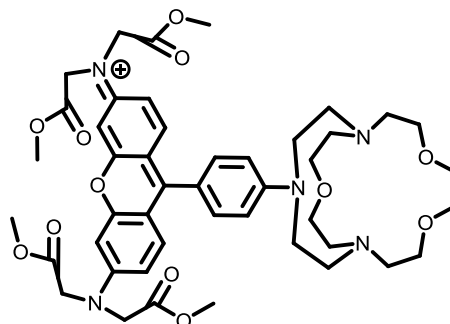
Synthesevorschrift für N-(9-(4-(4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)phenyl)-6-(bis(2-methoxy-2-oxoethyl)amino)-3H-xanthen-3-yliden)-2-methoxy-N-(2-methoxy-2-oxoethyl)-2-oxoethan-1-aminium (48)

In einem 5 ml Rundkolben wurden 44 mg (110 μmol) 4-(4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)benzaldehyd **40** und 66 mg (250 μmol) dimethyl 2,2'-((3-hydroxyphenyl)azanediyl)diacetat **55** in 3 ml Propionsäure vorgelegt, mit einer Spatelspitze TsOH versetzt und bei 65°C über Nacht gerührt. Nach dem Abkühlen wurde auf 36 ml 3 M NaOAc gegossen. Das entstandene Harz wurde von der wässrigen Phase abgetrennt und die wässrige Phase 2-mal mit Ethylacetat extrahiert. Harz und organische Phase wurden zusammen eingeeengt und getrocknet. Der erhaltene Leuko-Farbstoff wurde in Eisessig bei 110 °C 2 h gerührt, komplett eingeeengt, getrocknet, in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) gelöst und mit Chloranil als Oxidationsmittel 24 h unter RF gerührt. Das Produkt konnte mittels MS nachgewiesen, allerdings trotz Säulenchromatographie über Normalphase (Kieselgel 60, Eluent: DCM/MeOH, dann MeOH/ H_2O , dann MeOH/TEA) und Umkehrphase (RP-18 Kieselgel, Eluent: MeOH/ H_2O 1:1) nicht rein erhalten werden.

Summenformel: $\text{C}_{45}\text{H}_{58}\text{N}_5\text{O}_{12}^+$,
Molmasse: 860,97 g/mol.

Ausbeute: wenige mg, dunkler amorpher Feststoff.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 860,2 (100) [M^+].



5.3.5 Synthese von [2.1.1]-Farbstoff-Strukturen aus 34

Synthesevorschrift für 4-(4-(16,20-dioxo-4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)styryl)-1-methylpyridinium (49)

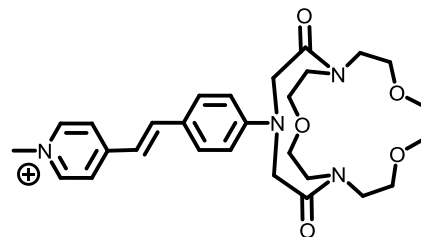
In einem 50 ml Rundkolben wurden 120 mg (286 μmol) 4-(16,20-dioxo-4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)benzaldehyd **34** und 70 mg (298 μmol) 1,4-Dimethylpyridiniumiodid in 10 ml trockenem MeCN vorgelegt, mit 30 μl Piperidin versetzt und bei 80 °C 4,5 h gerührt. Nach dem Erkalten wurde komplett eingeeengt und getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit neutralem Aluminiumoxid gereinigt. Als Eluent wurde MeCN mit steigendem Ethanolanteil verwendet. Die Reinigung blieb unvollständig.

Experimenteller Teil

Summenformel: $C_{28}H_{37}N_4O_5^+$,
Molmasse: 509,63 g/mol.

Ausbeute: 96 mg (66 %), dunkelroter Feststoff

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 509 (100) $[M^+]$.



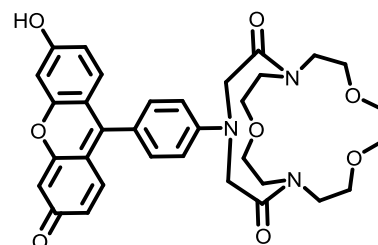
Synthesevorschrift für 18-(4-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)phenyl)-4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosane-16,20-dion (50)

In einem 5 ml RK wurden 100 mg (239 μ mol) 4-(16,20-dioxo-4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)benzaldehyd **34** und 60 mg (545 μ mol) Resorcinol in 1 ml $MeSO_3H$ und bei 74°C für 16 h gerührt. Nach dem Abkühlen wurde auf 10 ml 3 M NaOAc gegossen. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert, mit Wasser gewaschen, getrocknet, in $CHCl_3/MeOH$ (1:1) gelöst, eingengt und getrocknet. Ein Teil des Rohproduktes wurde weiter umgesetzt und ein anderer Teil über präparative Dünnschichtchromatographie mit $MeCN/MeOH$ (1:1) + CsCl als Eluent gereinigt. Es konnte kein Produkt isoliert werden.

Summenformel: $C_{33}H_{35}N_3O_8$, Molmasse: 601,66 g/mol.

Ausbeute: braunes Harz

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 603,2 (100) $[M+H^+]$.



5.3.6 Synthese der N-geschützten Kryptandderivate

Synthesevorschrift für 18-tosyl-4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-16,20-dion (54)

In einem getrockneten und ausgeheizten 100 ml Rundkolben wurden 310 mg (0,95 mmol) N-Tosyl-Iminodiessigsäurechlorid **7** in 30 ml trockenem DCM gelöst und unter starkem Rühren mit 200 mg (0,92 mmol) 1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan **5**, gelöst in 60 ml trockenem DCM, versetzt. Nach der Zugabe von 0,37 ml trockenem Triethylamin wurde 7 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde komplett eingengt, wieder in 20 ml DCM aufgenommen, 3-mal mit 2N HCl und einmal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet.

Experimenteller Teil

Das Lösungsmittel wurde entfernt und die braune, harzige Substanz getrocknet. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie mit neutralem Al_2O_3 und $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (20:1) als Eluent gereinigt.

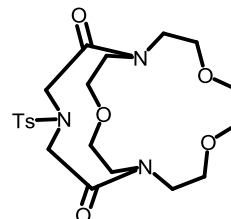
Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ Molmasse: 469,55 g/mol.

Ausbeute: 170 mg (40 %), braunes Harz.

MS (Micro-ESI) m/z (%): 492,1 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]$.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7,88 (m, 2 H, CH Ar); 7,23 (m, 2 H, CH Ar); 3,5 - 4,5 (m, 24 H, CH_2); 2,37 (s, 3 H, CH_3 Ar).

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 169,05 (C Amid); 143,02 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 137,81 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 128,85 (CH Ar); 127,6 (CH Ar); 68,95 (CH_2); 50,36 (CH_2).



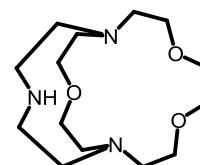
Synthesevorschrift für 4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan (55)

In einem getrockneten 50 ml Rundkolben wurden 240 mg (6,3 mmol) LiAlH_4 in 5 ml trockenem THF bei 0 °C vorgelegt. Unter Rühren wurden 180 mg 18-tosyl-4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-16,20-dion **54**, in 5 ml THF gelöst, zugegeben. Es trat eine leichte Gasentwicklung auf. Nach 2 h wurde die Temperatur auf RT erhöht und 1 h später auf 60 °C. Nach 16 h wurde mit etwa 5 ml NH_4Cl -Lösung auf pH 5 eingestellt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit THF gewaschen. Der Feststoff wurde verworfen. Das Filtrat wurde eingeeengt, die verbliebene wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase eingeeengt und getrocknet.

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$ Molmasse: 287,4 g/mol.

Ausbeute: wenige mg, gelbes Öl.

MS (DEI) m/z (%): 294 (100) $[\text{M}+\text{Li}^+]$.



5.3.7 Synthese der [2.1.1]-Derivaten aus Farbstoffen mit Iminodiessigsäuregruppe

Synthese der 31-Styrylfarbstoff-Derivate

In einem 50 ml Rundkolben wurden 200 mg (0,57 mmol) N,N-Diessigsäure-*tert*-butylester-4-aminobenzaldehyd **31** und 0,5 mmol der entsprechenden CH-aziden

Experimenteller Teil

Verbindung in 10 ml trockenem MeCN vorgelegt und mit 80 µl Piperidin versetzt. Die Reaktion wurde bei 80 °C 5 - 16 h gerührt, bis auf der DC kein Derivat **31** mehr zu sehen war. Nach dem Erkalten wurde komplett eingengt, es blieb ein rotes Harz zurück.

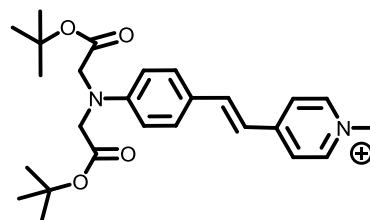
(E)-4-(4-(bis(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)styryl)-1-methylpyridin-1-ium (49)

Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation, aus EtOH mit wenig Wasser, gereinigt.

Summenformel: $C_{26}H_{35}N_2O_4^+$, Molmasse: 439,58 g/mol.

Ausbeute: 85 %, roter Feststoff.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 439,2 (100) $[M^+]$.



$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8,56 (d, J = 6 Hz, 2 H, CH); 7,89 (d, J = 6 Hz, 2 H, CH); 7,45 (m, 3 H, CH); 6,98 (d, J = 18 Hz, 1 H, CH); 6,56 (d, J = 8 Hz, 2 H, CH); 4,23 (s; 3 H; CH_3); 4,01 (s; 4 H; CH_2); 1,44 (s; 18 H; CH_3).

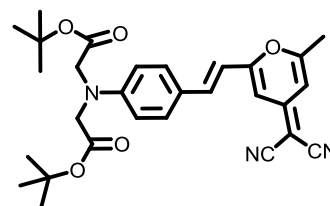
$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 168,77 (COO); 153,58 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 149,92 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 143,49 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 141,86 (CH); 130,4 (CH); 124,02 (CH); 122,94 (CH); 117,68 (CH); 111,9 (CH); 82,05 (CH); 53,9 (CH); 47,24 (CH_2); 27,75 (CH_3).

Di-tert-butyl-2,2'-((4-(2-(4-(dicyanomethylen)-6-methyl-4H-pyran-2-yl)vinyl)phenyl)azanediyl)(E)-diacetat (44)

Summenformel: $C_{29}H_{33}N_3O_5$, Molmasse: 503,6 g/mol.

Ausbeute: 90 %, rotes Harz.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 526,2 (100) $[M+\text{Na}^+]$.



$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7,39 (m, 4 H, CH); 6,58 (m, 4 H, CH); 4,05 (s; 4 H; CH_2); 2,38 (s; 3 H; CH_3); 1,48 (s; 18 H; CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 169,31 (COO); 167,35 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 162,29 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 160,17 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 159,07 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 156,47 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 149,92 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 138,33 (CH); 129,65 (CH); 126,98 (CH); 123,62 (CH); 112,35 (CH); 105,82 (CH); 82,22 (CH); 54,36 (CH_3); 48,07 (CH_2); 28,06 (CH_3).

Spaltung der tert-Butylester 44 und 49

Experimenteller Teil

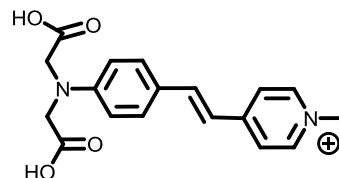
In einem 50 ml Rundkolben wurden 30 μ mol des entsprechenden *tert*-Butylesters in 2,5 ml CHCl_3 vorgelegt, mit 7,5 ml TFA und 5 Tropfen H_2O versetzt und 30 min bei RT gerührt. Das resultierende Rohprodukt wurde eingeeengt und getrocknet.

(E)-4-(4-(bis(carboxymethyl)amino)styryl)-1-methylpyridin-1-ium (63)

Das Rohprodukt wurde mit Aceton versetzt und der Niederschlag wurde abgesaugt, mit wenig Aceton gewaschen und getrocknet.

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4^+$, Molmasse: 327,36 g/mol.

Ausbeute: 92 %, roter Feststoff.



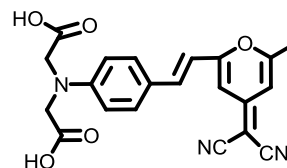
^1H NMR (250 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 8,71 (d, J = 7,5 Hz, 2 H, CH); 8,07 (d, J = 7,5 Hz, 2 H, CH); 7,91 (d, J = 15 Hz, 2 H, CH); 7,59 (d, J = 7,5 Hz, 2 H, CH); 7,21 (d, J = 15 Hz, 2 H, CH); 6,65 (d, J = 7,5 Hz, 2 H, CH); 4,19 (m; 7 H; CH_3 , CH_2).

^{13}C NMR (63 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 172,05 (COOH); 158,4 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 153,68 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 150,54 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 144,93 (CH); 130,39 (CH); 124, 2 (CH); 122,87 (CH); 118,58 (CH); 112,45 (CH); 53,15 (CH_2); 46,9 (CH_3).

(E)-2,2'-((4-(2-(4-(dicyanomethylen)-6-methyl-4H-pyran-2-yl)vinyl)phenyl) azanediyl)diessigsäure (62)

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$, Molmasse: 391,12 g/mol.

Ausbeute: 95 %, rot-braunes Harz.



^1H NMR (400 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 7,68 (m, 2 H, CH); 7,55 (d; J = 12; 1 H; CH); 7,08 (m, 1 H, CH); 6,7 (m, 4 H, CH); 4,18 (s; 4 H; CH_2); 2,38 (s; 3 H; CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 172,15 (COOH); 165,39 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 164,3 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 161,32 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 157,74 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 131,93 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 130,14 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 116,31 (CH); 115,79 (CH); 112,4 (CH); 111,86 (CH); 106,57 (CH); 105,82 (CH); 53,17 (CH_2); 28,06 (CH_3).

Kryptandsynthese der 31-Styrylfarbstoff-Derivate

In einem 50 ml Rundkolben wurden 0,37 mmol (E)-2,2'-((4-(2-(4-(dicyanomethylen)-6-methyl-4H-pyran-2-yl)vinyl)phenyl) azanediyl)diessigsäure **62** oder (E)-4-(4-(bis(carboxymethyl)amino)styryl)-1-methylpyridin-1-ium **63** in 15 ml trockenem Toluol vorgelegt, mit 4 Tropfen Pyridin und 0,4 ml Oxalylchlorid versetzt und 4 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde komplett eingeeengt und getrocknet. Das entstandene

Experimenteller Teil

Säurechlorid wurde in 20 ml trockenem DCM gelöst und unter starkem Rühren mit 82 mg (0,37 mmol) 1,4,10-trioxa-7,13-diazacyklopentadecan **37** versetzt. Nach der Zugabe von 0,13 ml trockenem Triethylamin wurde für 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde komplett eingengt und getrocknet.

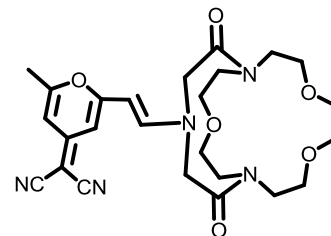
(E)-2-(2-(4-(16,20-dioxo-4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)styryl)-6-methyl-4H-pyran-4-yliden)malononitril (**64**)

Die Reinigung des Rohproduktes blieb unvollständig.

Summenformel: $C_{31}H_{35}N_5O_6$ Molmasse: 573,65 g/mol.

Ausbeute: roter Feststoff.

MS (Micro-ESI pos.) m/z (%): 546,1 (36); 569,1 (100) [$M+Na^+$]; 792 (44); 1169,1 (20) [$2M+Na^+$].



4-(4-(16,20-dioxo-4,7,13-trioxa-1,10,18-triazabicyclo[8.5.5]icosan-18-yl)styryl)-1-methylpyridinium (**49**)

Derivat **49** konnte über diesen Syntheseweg nicht erhalten werden.

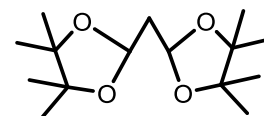
5.4 Synthese der [16]Krone-5-basierenden Natriumindikatoren

Synthesevorschrift für Bis(4,4,5,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-2-yl)methan (**65**)

In einem 500 ml Rundkolben wurden 14,54 g (123 mmol) Pinacol, 10 g (61 mmol) Malonaldehydbisdimethylacetal und 210 mg (12 mmol) Toluolsulfonsäure in 200 ml trockenem Toluol gelöst und unter RF 3 h gerührt. Nach dem Abkühlen wurde fast komplett eingengt, mit wenig Ethanol versetzt und über Nacht stehen gelassen. Nach dem Absaugen des entstandenen Niederschlages wurde das Filtrat erneut eingengt und es konnte nach einiger Zeit weiterer Niederschlag abgesaugt werden.

Summenformel: $C_{15}H_{28}O_4$, Molmasse: 272,38 g/mol.

Ausbeute: 13,25 g (83 %), weiße Kristalle.



Smp. 77 – 79 °C (Lit.: 79 – 80°C).

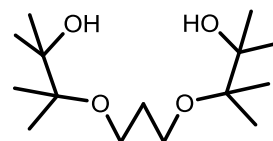
1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 5,19 (t, J = 5,5 Hz, 2 H, CH_2); 1,91 (t, J = 5,5 Hz, 2 H, CH); 1,19 (s, 24H, CH_3).

Synthesevorschrift für 1,1,2,2,8,8,9,9-Octamethyl-3,7-dioxanonan-1,9-diol (66)

In einem 500 ml Rundkolben wurden 18 g (135 mmol) AlCl_3 in 200 ml trockenem Ether vorgelegt und bei 0 °C mit 1,5 g (40 mmol) LiAlH_4 versetzt und 30 min gerührt. Zu diesem Gemisch wurden langsam 6 g (22 mmol) Bis(4,4,5,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-2-yl)methan gegeben und 3 h bei RT gerührt. Um überschüssiges Hydrid zu zersetzen, wurden 50 ml Wasser langsam zugegeben, gefolgt von verdünnter Schwefelsäure, bis die Wasserphase fast klar war. Die Etherphase wurde abgetrennt, eingeeengt und getrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über eine säulenchromatographische Trennung mit DCM/Ethylacetat 5:1.

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{O}_4$, Molmasse: 276,42 g/mol.

Ausbeute: 5 g (82 %), farbloses Öl.



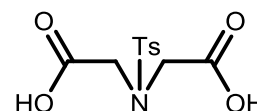
$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3,47 (m, 4 H, CH_2); 2,54 (s, 2H, OH); 1,79 (m, 2 H, CH_2); 1,18 (m, 24H, CH_3).

Synthesevorschrift für N-Tosyl-iminodiessigsäure (71)

In einem 500 ml Rundkolben wurden 13,6 g (0,1 mol) Iminodiessigsäure in 200 ml 2 N NaOH gelöst und innerhalb von 2 h mit einer Lösung von 22,6 g (0,119 mol) Tosylchlorid, in Ether, versetzt. Die Mischung wurde 16 h gerührt, beide Phasen getrennt und die Wasserphase mit HCl auf pH = 1 eingestellt. Es entstand nach einigem Stehen ein weißer Niederschlag. Dieser wurde filtriert, das Filtrat wurde angesäuert und der entstandene Niederschlag ebenfalls filtriert. Der weiße Feststoff wurde in Wasser umkristallisiert, filtriert, getrocknet, mit wenig Pentan gewaschen und getrocknet.

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_6\text{S}$, Molmasse: 287,29 g/mol.

Ausbeute: 14 g (50 %), weißer Feststoff.



Smp. 202 °C (Lit.: 193 - 194 °C).

MS (Micro-ESI) m/z (%): 310 (100) $[\text{M}+\text{Na}^+]$.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 7,68 (d; $J = 8,3$; 2 H; CH); 7,38 (d; $J = 8,1$; 2 H; CH); 3,9 (s; 4H; CH_2); 2,37 (s; 3H; CH_3).

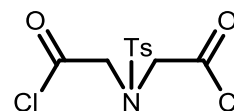
$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 171,04 (COOH); 143,61 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 137,01 ($\text{C}_{\text{quart.}}$); 130,09 (CH Ar); 127,31 (CH Ar); 50,67 (CH_2); 21,41 (CH_3).

Synthesevorschrift für N-Tosyl-iminodiessigsäurechlorid (**72**)

In einem 50 ml Rundkolben wurden 2,3 g (8 mmol) N-Tosyl-iminodiessigsäure in 10 ml Toluol suspendiert und anschließend mit 3 Tropfen DMF und 5 ml Thionylchlorid versetzt. Es wurde 4 h gerührt. Nach einiger Zeit entstand eine klare Lösung. Diese wurde eingeeengt und getrocknet. Bei Zugabe von Ether entstand ein gelber Feststoff, welcher filtriert und mit Ether gewaschen wurde. Von einer Probe wurde ein NMR gemessen, der Rest wurde gleich weiter umgesetzt.

Summenformel: $C_{11}H_{11}Cl_2NO_4S$, Molmasse: 324,18 g/mol.

Ausbeute: 2,45 g (95 %), gelber Feststoff.



1H NMR (250 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 7,69 (d, J = 8,3, 2 H, CH); 7,36 (d, J = 8,05, 2 H, CH); 4,02 (s, 4H, CH_2); 2,36 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, D-DMSO): δ (ppm) = 170,38 (COCl); 143,57 ($C_{quart.}$); 137,24 ($C_{quart.}$); 129,97 (CH Ar); 127,44 (CH Ar); 48,7 (CH_2); 21,42 (CH_3).

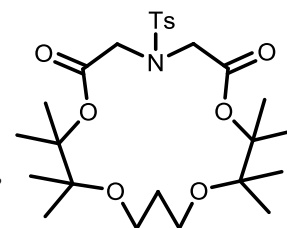
Synthesevorschrift für 2,2,3,3,11,11,12,12-octamethyl-7-tosyl-1,4,10,13-tetraoxa-7-azacyclohexadecan-5,9-dion (**73**)

In einem 100 ml Zweihalskolben wurden 100 mg NaH (60 %ige Öldispersion) in 10 ml trockenem Toluol vorgelegt und bei 80°C gerührt. Innerhalb von 2,5 h wurden 200 mg (724 μ mol) 3,3'-(propane-1,3-diylbis(oxy))bis(2,3-dimethylbutan-2-ol) **66** und 233 mg (724 μ mol) N-Tosyl-iminodiessigsäurechlorid **72**, gelöst in 5 ml trockenem Toluol, langsam zugetropft. Bei 110 °C wurde für 36 h gerührt, nach dem Erkalten mit 200 μ l MeOH versetzt und nachdem die Gasentwicklung beendet war, komplett eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt mit Kieselgel 60 und Cyclohexan mit steigendem DCM-Anteil, dann DCM mit steigendem Essigester-Anteil. Es konnte nur eine kleine, noch verunreinigte Menge an **73** erhalten werden.

Summenformel: $C_{26}H_{41}NO_8S$, Molmasse: 527,67 g/mol.

Ausbeute: 10 mg (3 %), weißer Feststoff.

MS (Micro-ESI) m/z (%): 549,8 (100) $[M+Na^+]$, 309,9 (75), 1069,5 (70).



5.5 Spektroskopische Experimente

5.5.1 Vorversuch zur Messung der Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz

Die aus den chemischen Experimenten gewonnenen Ionophor-Farbstoff-Strukturen wurden in einer 10 mM Hepes-Lösung (pH 7,4) gelöst. Die unlöslichen Strukturen wurden in einer kleinen Menge DMSO gelöst und dann zur Hepes-Lösung zugegeben. Die Fluoreszenz der Lösungen wurde vor und nach der Zugabe einiger Tropfen gesättigter NaCl-Lösung gemessen. Nur bei den Derivaten **12**, **13**, **19** und **17** zeigte sich eine starke Natriumabhängigkeit der Fluoreszenz.

5.5.2 Bestimmung der relativen Quantenausbeute

Die relative Quantenausbeute der Verbindungen (Φ_x) wurde gegen eine Fluoresceinlösung, mit einer absoluten Quantenausbeute von $0,91 \pm 0,05$ (Φ_s), als Standard ermittelt.^{43, 44} Die Lösungen der Proben wurden mit 10 mM Hepes gepuffert und auf pH = 7,4 eingestellt und der Standard, das Fluorescein, wurde in 0,1 M NaOH gelöst. Bei einer festen Wellenlänge wurde die Absorption von Standard (A_s) und Probe (A_x) auf einen Bereich von 0,04 – 0,05 A eingestellt. Von beiden Proben wurde, bei dieser Wellenlänge die Fluoreszenzintensität bestimmt. Aus den um den Leerwert korrigierten Fluoreszenzspektren konnten die Flächen (F_s und F_x) unter den Kurven ermittelt werden. Nun wurden noch die Brechungsindizes der Lösungsmittel von Standard (n_s) und Probe (n_x) gemessen und aus Gleichung (8) konnten mit Hilfe der Quantenausbeute des Standards (Φ_s) die relativen Quantenausbeuten der Proben (Φ_x) bestimmt werden.⁴³

$$\Phi_x = \frac{A_s}{A_x} \frac{F_x}{F_s} \left(\frac{n_x}{n_s} \right)^2 \Phi_s \quad (8)$$

5.5.3 Bestimmung der pH- und K⁺-Abhängigkeit der Fluoreszenz

Zur Messung der pH-Abhängigkeit wurde die Fluoreszenz von 5 µM Indikatorlösungen in 10 mM Hepes, die 0 mM oder 100 mM NaCl enthielten, bei pH 6,8; 7,4 und 7,6 gemessen. Zur Untersuchung der K⁺-Abhängigkeit wurde die Fluoreszenz von 5 µM Indikatorlösungen in 10 mM Hepes, die 0 mM oder 100 mM KCl enthielten, bei pH 7,4 gemessen.

5.5.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die Indikatorkonzentration betrug bei allen Messungen 5 µM. Alle Lösungen wurden mit 10 mM Hepes gepuffert und auf pH = 7,4 eingestellt. Für jede Messreihe wurden je eine Küvette mit 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 150 mM NaCl vorbereitet. Um eine konstante Ionenstärke zu gewährleisten, wurde NaCl durch TMAcI oder KCl so komplementiert, dass die Gesamtkonzentration der Salze bei 150 mM lag. Die Fluoreszenzspektren mit den Indikatorlösungen, die 0 – 150 mM NaCl enthielten, wurden gemessen. Das Fluoreszenzspektrum bei 0 mM NaCl wurde auf 1 normiert und die Spektren der höheren Natriumionenkonzentrationen auf dieses normierte Spektrum skaliert. Die erhaltene relative Fluoreszenzintensität F/F_{\min} wurde in Abhängigkeit von der Natriumionenkonzentration aufgetragen und die Anpassung der Parameter von Gleichung (7) an die Daten lieferte den entsprechenden K_d Wert.^{6, 45, 46} Die maximale Änderung der Fluoreszenzintensität ergab sich aus Parameter p durch $F_{\max} = p + 1$. Die Berechnungen wurden mit OriginPro 8.5.1G (ORIGINLAB) vorgenommen.

$$\frac{F}{F_{\min}} = \frac{p[\text{Na}]}{K_d + [\text{Na}]} + 1, \quad \text{wobei} \quad \frac{F_{\max}}{F_{\min}} = 1 + p \quad (9)$$

5.6 Zellbiologische Experimente

5.6.1 Beladung von HEK-293 und COS-7 Zellen mit hergestellten Ionophor-Farbstoffstrukturen

Die auf Deckgläschen angewachsenen HEK-293 oder COS-7 Zellen wurden mit 2,5 ml DMEM (ohne FCS und Phenolrot) und 2,5 µl der entsprechenden Farbstoff-

Stammlösung (5 mM, DMSO) versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Farbstofflösung wurde entfernt und die Zellen 2-mal mit je 2 ml PBS pH 7,4 (37 °C) gewaschen. Das Deckgläschen wurde in die Mikroskopiemesskammer eingelegt und mit 1 ml PBS (37 °C) überschichtet. Die Zellen wurden unter dem LSM 510 untersucht. Die Bilder wurden in Graustufen gemessen und ihre Darstellung erfolgte in Falschfarben. Für das Styrylderivat **23** wurde rot als Falschfarbe gewählt ($\lambda_{\text{max, em}} = 638 \text{ nm}$) und für die Xanthenderivate grün ($\lambda_{\text{max, em}} = 510 - 520 \text{ nm}$).

5.6.2 Messung der Fluoreszenzänderung von **13** und **17** in Zellen bei inhibierter Na-K-ATPase

Die auf Deckgläschen angewachsenen HEK-293 oder COS-7 Zellen wurden 2-mal mit je 2 ml PBS (pH 7,4; 37 °C) gewaschen, in die Mikroskopiemesskammer eingelegt und mit 1 ml DMEM (ohne FCS und Phenolrot) überschichtet. Es wurden einige Zellen ausgewählt und mit dem LSM 510 wurde eine Zeitserie gestartet, bei der alle 60 s eine Messung erfolgte. Nach etwa 10 min wurde das Medium über den Zellen mit 1,25 μl **17** oder **13** (5 mM) versetzt und vermischt. Einige Zeit später wurden 1,25 μl Ouabain (10 mM) zugegeben. Durch Ouabain wurde die Na-K-ATPase inhibiert und Natriumionen strömten in die Zelle ein, wodurch sich die Fluoreszenz erhöhte. Nach dem Beenden der Zeitserie wurden, mit der Gerätesoftware des LSM 510 (Version 3.2, SP2, ZEISS) drei „Region of Interest“ (ROI), die je eine Zelle umfassten, bestimmt. Die Daten der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit wurden exportiert. Mit Origin (ORIGINLAB) wurde der Mittelwert der Fluoreszenz der drei Zellen gebildet und gegen die Zeit aufgetragen. Nach der Zugabe des Indikators stieg die Fluoreszenz und blieb nach einiger Zeit konstant, auf diesen Wert wurde die Fluoreszenzintensität normiert.

6 Literatur

- [1] Skou, J. C. (1988) Overview: The Na,K-pump, In *Methods in Enzymology* (Sidney Fleischer, B. F., Ed.), pp 1-25, Academic Press.
- [2] Klinke, R., Pape, H.-C., und Silbernagl, S. (2005) Physiologie, 5., komplett überarb. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- [3] Biskup, C., und Gensch, T. (2015) Fluorescence lifetime imaging of ions in biological tissues, In *Fluorescence Lifetime Spectroscopy und Imaging : Principles und Applications in Biomedical Diagnostics* (Marcu, L., French, P. M. W., und Elson, D. S., Eds.), CRC Press.
- [4] Schwedt, G. (1995) *Analytische Chemie Grundlagen, Methoden und Praxis*; Thieme, Stuttgart.
- [5] Liebling, M. S., und Gupta, R. K. (1987) A Comparison of Intracellular Sodium Ion Concentrations in Neoplastic und Nonneoplastic Human Tissue Using ^{23}Na NMR Spectroscopy, *Annals of the New York Academy of Sciences* 508, 149-163.
- [6] Grynkiewicz, G., Poenie, M., und Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Biol Chem* 260, 3440-3450.
- [7] Valeur, B., und Leray, I. (2000) Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition, *Coordination Chemistry Reviews* 205, 3-40.
- [8] Minta, A., und Tsien, R. Y. (1989) Fluorescent indicators for cytosolic sodium., In *J. Biol. Chem.*, pp 19449 - 19457.
- [9] Kuhn, M. A., und Haugland, R. P. (1995) Fluorescent Ion-Selective Diaryldiaza Crown Ether Conjugates, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg., US.
- [10] Gee, K., und Martin, V. (2005) Crown Ether Derivatives, p 136, US.
- [11] Martin, V. V., Rothe, A., Diwu, Z., und Gee, K. R. (2004) Fluorescent sodium ion indicators based on the 1,7-diaza-15-crown-5 system, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 5313-5316.
- [12] Martin, V. V., Rothe, A., und Gee, K. R. (2005) Fluorescent metal ion indicators based on benzoannelated crown systems: a green fluorescent indicator for intracellular sodium ions, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 1851-1855.
- [13] Minta, A., und Escamilla, P. R. (2012) Cytosolic fluorescent ion indicators, C07D 413/14 (2006.01), p 59, ASANTE RESEARCH, LLC, US.
- [14] Pressman, B. C., Harris, E. J., Jagger, W. S., und Johnson, J. H. (1967) Antibiotic-mediated transport of alkali ions across lipid barriers, *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 1949-1956.
- [15] Vögtle, F. (1992) *Supramolekulare Chemie eine Einführung*, 2., überarb. und erw. Aufl., Teubner, Stuttgart.

- [16] Pedersen, C. J. (1967) Cyclic polyethers und their complexes with metal salts, *Journal of the American Chemical Society* 89, 7017-7036.
- [17] Gokel, G. W., Dishong, D. M., Schultz, R. A., und Gatto, V. J. (1982) Syntheses of Aliphatic Azacrown Compounds, *Synthesis* 1982, 997-1012.
- [18] Bradshaw, J. S., Hui, J. Y., Chan, Y., Haymore, B. L., Izatt, R. M., und Christen, J. (1974) Macrocyclic Polyether Sulfide Syntheses - Preparation of Thia-Crown-5, 6 and 7 Compounds (1,2), *J Heterocyclic Chem* 11, 45-49.
- [19] Kauffmann, T., und Ennen, J. (1985) Multi Electron Ligands .9. Synthesis of 3 Crown Arsanes, *Chem Ber-Recl* 118, 2692-2702.
- [20] Izatt, R. M., Pawlak, K., Bradshaw, J. S., und Bruening, R. L. (1991) Thermodynamic and kinetic data for macrocycle interactions with cations and anions, *Chemical Reviews* 91, 1721-2085.
- [21] Steed, J. W., und Atwood, J. L. (2009) *Supramolecular chemistry*, 2. ed., Wiley, Chichester.
- [22] Dishong, D. M., und Gokel, G. W. (1982) Crown Cation Complex Effects .16. Solvent Dependence of the 15-Crown-5 and 18-Crown-6 Equilibria with Sodium-Cation, *J Org Chem* 47, 147-148.
- [23] de Silva, A. P., Gunaratne, H. Q. N., Gunnlaugsson, T., und Nieuwenhuizen, M. (1996) Fluorescent switches with high selectivity towards sodium ions: correlation of ion-induced conformation switching with fluorescence function, *Chemical Communications*, 1967-1968.
- [24] Hoiland, H., Ringseth, J. A., und Brun, T. S. (1979) Cation-Crown Ether Complex-Formation in Water .2. Alkali and Alkaline-Earth Cations and 12-Crown-4, 15-Crown-5, and 18-Crown-6, *J Solution Chem* 8, 779-792.
- [25] Takeda, Y., Kimura, T., Kudo, Y., Matsuda, H., Inoue, Y., und Hakushi, T. (1989) Solvent-Extraction of Univalent and Bivalent-Metal Picrates with 16-Crown-5 into Benzene, *B Chem Soc Jpn* 62, 2885-2889.
- [26] Suzuki, K., Sato, K., Hisamoto, H., Siswanta, D., Hayashi, K., Kasahara, N., Watanabe, K., Yamamoto, N., und Sasakura, H. (1996) Design and synthesis of sodium ion-selective ionophores based on 16-crown-5 derivatives for an ion-selective electrode, *Anal Chem* 68, 208-215.
- [27] Gutsche, C. D. (1989) *Calixarenes*, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- [28] Baeyer, A. (1872) Ueber die Verbindungen der Aldehyde mit den Phenolen und aromatischen Kohlenwasserstoffen, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 5, 1094-1100.
- [29] Gutsche, C. D., Dhawan, B., No, K. H., und Muthukrishnan, R. (1981) Calixarenes .4. The Synthesis, Characterization, and Properties of the Calixarenes from Para-Tert-Butylphenol, *Journal of the American Chemical Society* 103, 3782-3792.
- [30] Zinke, A., und Ziegler, E. (1941) Zur Kenntnis des Härtnungsprozesses von Phenol-Formaldehyd-Harzen, VII. Mitteilung, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A und B Series)* 74, 1729-1736.

- [31] Yukihiro Nishimura, T. T., Sadao Arai. (2007) Effective fluorescent sensing of Na⁺ ion by calix[4]arene bearing pyrene and perylene based on energy transfer, *ARKIVOC* 2007, 259-268.
- [32] Dietrich, B., Lehn, J. M., Sauvage, J. P., und Blanzat, J. (1973) Cryptates—X: Syntheses et propriétés physiques de systèmes diaza-polyoxa-macrobicycliques, *Tetrahedron* 29, 1629-1645.
- [33] de Silva, A. P., und de Silva, S. A. (1986) Fluorescent signalling crown ethers; 'switching on' of fluorescence by alkali metal ion recognition and binding in situ, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1709-1710.
- [34] Golchini, K., Mackovicbasic, M., Gharib, S. A., Masilamani, D., Lucas, M. E., und Kurtz, I. (1990) Synthesis and Characterization of a New Fluorescent-Probe for Measuring Potassium, *Am J Physiol* 258, F438-F443.
- [35] Bourson, J., und Valeur, B. (1989) Ion-responsive fluorescent compounds. 2. Cation-steered intramolecular charge transfer in a crowned merocyanine, *The Journal of Physical Chemistry* 93, 3871-3876.
- [36] Valeur, B., Bourson, J., und Pouget, J. (1993) Ion Recognition Detected by Changes in Photoinduced Charge or Energy-Transfer, *Acs Sym Ser* 538, 25-44.
- [37] Magdolen, P., Meciarova, M., und Toma, S. (2001) Ultrasound effect on the synthesis of 4-alkyl-(aryl)aminobenzaldehydes, *Tetrahedron* 57, 4781-4785.
- [38] Bacci, J. P., Kearney, A. M., und Van Vranken, D. L. (2005) Efficient two-step synthesis of 9-aryl-6-hydroxy-3H-xanthen-3-one fluorophores, *J Org Chem* 70, 9051-9053.
- [39] Noguchi, M., Skwarczynski, M., Prakash, H., Hirota, S., Kimura, T., Hayashi, Y., und Kiso, Y. (2008) Development of novel water-soluble photocleavable protective group and its application for design of photoresponsive paclitaxel prodrugs, *Bioorgan Med Chem* 16, 5389-5397.
- [40] Hirayama, T., Iyoshi, S., Taki, M., Maeda, Y., und Yamamoto, Y. (2007) Synthesis of a new bifunctionalised fluorescent label and physical properties of the bound form on model peptide of troponin C, *Organic & Biomolecular Chemistry* 5, 2040-2045.
- [41] Tanha, M. (2014) Computational und Experimental Characterization of a Fluorescent Dye for Detection of Potassium Ion Concentration, *The journal of physical chemistry. A, Molecules, spectroscopy, kinetics, environment, & general theory* 118, 9837-9843.
- [42] AG, H. (1909) Verfahren zur Darstellung roter Säurefarbstoffe der Triphenylmethanreihe., AT.
- [43] Fery-Forgues, S., und Lavabre, D. (1999) Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationary products, *J Chem Educ* 76, 1260-1264.

- [44] Brouwer, A. M. (2011) Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl Chem* 83, 2213-2228.
- [45] Dietrich, S. (2008) Fluoreszenzindikatoren für intrazelluläre Natriumkonzentrationsmessungen, In *Medizinischen Fakultät*, p 137, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- [46] Winslow, J. L., Cooper, R. L., und Atwood, H. L. (2002) Intracellular ionic concentration by calibration from fluorescence indicator emission spectra, its relationship to the K-d, F-min, F-max formula, and use with Na-Green for presynaptic sodium, *Journal of Neuroscience Methods* 118, 163-175.
- [47] Despa, S., Vecer, J., Steels, P., und Ameloot, M. (2000) Fluorescence lifetime microscopy of the Na⁺ indicator Sodium Green in HeLa cells, *Anal Biochem* 281, 159-175.
- [48] Szmajcinski, H., und Lakowicz, J. R. (1997) Sodium Green as a potential probe for intracellular sodium imaging based on fluorescence lifetime, *Anal Biochem* 250, 131-138.
- [49] Roder, P., und Hille, C. (2014) ANG-2 for quantitative Na⁺ determination in living cells by time-resolved fluorescence microscopy, *Photoch Photobio Sci* 13, 1699-1710.
- [50] Parker, D. (1996) *Macrocyclic synthesis : a practical approach*, Oxford University Press, Oxford ; New York.
- [51] Gryko, D. T., Gryko, D., und Jurczak, J. (1999) Improved method for the preparation of macrocyclic diamides, *Synlett*, 1310-1312.
- [52] Taki, M., Watanabe, Y., und Yamamoto, Y. (2009) Development of ratiometric fluorescent probe for zinc ion based on indole fluorophore, *Tetrahedron Letters* 50, 1345-1347.
- [53] Wanichacheva, N., Soto, E. R., Lambert, C. R., und McGimpsey, W. G. (2006) Surface-based lithium ion sensor: An electrode derivatized with a self-assembled monolayer, *Analytical Chemistry* 78, 7132-7137.
- [54] Yanai, H., Takahashi, A., und Taguchi, T. (2010) 1,4-Addition of silicon dienates to alpha,beta-unsaturated aldehydes catalyzed by in situ-generated silicon Lewis acid, *Chemical Communications* 46, 8728-8730.
- [55] Kamitori, Y., Hojo, M., Masuda, R., und Yoshida, T. (1985) Alumina as an Versatile Catalyst for the Selective Acetalization of Aldehydes, *Tetrahedron Letters* 26, 4767-4770.
- [56] Aoyama, T., Takido, T., und Kodomari, M. (2004) Silica gel-supported polyphosphoric acid (PPA/SiO₂) as an efficient and reusable catalyst for conversion of carbonyl compounds into oxathioacetals and dithioacetals, *Synlett*, 2307-2310.
- [57] Cha, J. S., und Brown, H. C. (1993) Reaction of Aluminum-Hydride Triethylamine Complex with Selected Organic-Compounds Containing Representative Functional-Groups, *J Org Chem* 58, 3974-3979.

- [58] Brückner, R. (2009) *Reaktionsmechanismen organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, 3. Aufl., aktualisiert und überarb., 2. korrigierter Nachdr., Spektrum Akad. Verl., Berlin [u.a.].
- [59] Dess, D. B., und Martin, J. C. (1983) Readily Accessible 12-I-5 Oxidant for the Conversion of Primary and Secondary Alcohols to Aldehydes and Ketones, *J Org Chem* 48, 4155-4156.
- [60] Graf, E., und Lehn, J. M. (1981) Spherical Cryptates - Synthesis and Inclusion-Complexes of Spherical Macrotricyclic Ligands, *Helv Chim Acta* 64, 1040-1057.
- [61] Tabushi, I., Okino, H., und Kuroda, Y. (1976) Convenient Synthesis of Macrocyclic-Compounds Containing 2 of Nitrogen, Oxygen or Sulfur-Atoms, *Tetrahedron Letters*, 4339-4342.
- [62] Pilichowski, J. F., Lehn, J. M., Sauvage, J. P., und Gramain, J. C. (1985) Synthesis of Polyazotic Macrocyclic Coordinates Carrying a Discriminated Secondary Amine Function, *Tetrahedron* 41, 1959-1964.
- [63] Xiang, Y.-Z., Feng, Z.-H., Zhang, J., Liao, Y.-L., Yu, C.-J., Yi, W.-J., Zhu, W., und Yu, X.-Q. (2010) Linear cyclen-based polyamine as a novel and efficient reagent in gene delivery, *Organic & Biomolecular Chemistry* 8, 640-647.
- [64] Wilson, J. M., Giordani, F., Farrugia, L. J., Barrett, M. P., Robins, D. J., und Sutherland, A. (2007) Synthesis, characterisation and anti-protozoal activity of carbamate-derived polyazamacrocycles, *Organic & Biomolecular Chemistry* 5, 3651-3656.
- [65] Mikhura, I. V., und Formanovskii, A. A. (1989) Synthesis of Macroheterocycles - Analogs of Dibenzo-Crowns .4. 15=18-Membered Pyridine-Containing Crowns, *Khim Geterotsikl*+, 1559-1562.
- [66] Murakata, M., Yamada, K., und Hoshino, O. (1996) Oxidative cyclisation of o-phenolic oxime-acid derivatives using phenyliodonium diacetate: Synthesis of spiroisoxazoline derivatives, *Tetrahedron* 52, 14713-14722.
- [67] Meth-Cohn, O. (1986) A simple, powerful, and efficient method for transesterification, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 695-697.
- [68] Vasin, V. A., und Razin, V. V. (2001) Mild and efficient method for preparation of tert-butyl esters, *Synlett*, 658-660.
- [69] Rudrawar, S., Kondaskar, A., und Chakraborti, A. K. (2005) An efficient acid- and metal-free one-pot synthesis of benzothiazoles from carboxylic acids, *Synthesis-Stuttgart*, 2521-2526.

Literatur

- [70] Carlson, L. J., Welby, J., Zebrowski, K. A., Wilk, M. M., Giroux, R., Ciancio, N., Tanski, J. M., Bradley, A., und Tyler, L. A. (2011) Spectroscopic differences between heterocyclic benzothiazoline, -thiazole and imine containing ligands and comparison of the Co and Cu pyridine benzothiazole and imine complexes, *Inorg Chim Acta* 365, 159-166.
- [71] Guram, A. S., und Buchwald, S. L. (1994) Palladium-Catalyzed Aromatic Aminations with in situ Generated Aminostannanes, *Journal of the American Chemical Society* 116, 7901-7902.

7 Anhang

7.1 Röntgenkristallstrukturen

7.1.1 Röntgenkristallstruktur von Verbindung 7

Verbindung	7		
Kürzel	FO5638		
Farbe	weiß	P _{ber.} [g/cm ³]	1,313
Summenformel	C ₂₆ H ₃₄ N ₂ O ₇	Absorptions-Koeffizient μ [cm ⁻¹]	0,95
M _R	486,55	Zahl der gemessenen Reflexe	9560
Messtemperatur [°C]	-140(2)	symmetrieunabhängige Reflexe	2826
Kristallsystem	monoklin	Vollständigkeit Θ _{max} [%]	99,7
Raumgruppe	C2/c	Beobachtete Reflexe	2826
Gitterparameter a [Å]	31.8181(7)	Messbereich Θ [°]	2,36<Θ<27,49
b [Å]	8,9603(2)	Anzahl der verfeinerten Parameter	227
c [Å]	8,6388(2)	R1 _{obs}	0,0416
α[°]	90,00	R2 _{obs}	0,0939
β[°]	92,166(1)	R1 _{all}	0,0494
γ[°]	90,00	wR2 _{all}	0,0,0982
Elementarzellenvolumen V[Å ³]	2461,16(10)	GOF	1,086
Kristallgröße [mm ³]	0,045x0,045x0,034	Restelektronendichte [e Å ³]	0,251 / -0,172
Moleküle pro Elementar- zelle Z	4	P _{ber.} [g/cm ³]	1,313

Verbindung 7: Bindungslängen (Å) und Winkel (°)

O(1)-C(1)#1	1.4258(15)	O(1)-C(1)	1.4258(15)
O(2)-C(5)	1.4204(17)	O(2)-C(4)	1.4252(16)
O(3)-C(7)	1.3686(16)	O(3)-C(12)	1.4255(16)
O(4)-C(13)	1.2104(18)	N(1)-C(6)	1.3905(16)
N(1)-C(2)	1.4613(16)	N(1)-C(3)	1.4700(18)
C(1)-C(2)	1.515(2)	C(1)-H(1B)	0.988(16)
C(1)-H(1A)	0.977(17)	C(2)-H(2B)	0.957(15)
C(2)-H(2A)	1.007(16)	C(3)-C(4)	1.510(2)
C(3)-H(3B)	0.973(15)	C(3)-H(3A)	0.985(16)
C(4)-H(4B)	0.979(16)	C(4)-H(4A)	1.010(18)
C(5)-C(5)#1	1.504(3)	C(5)-H(5B)	0.980(17)
C(5)-H(5A)	0.994(17)	C(6)-C(11)	1.4054(19)
C(6)-C(7)	1.4250(17)	C(7)-C(8)	1.3775(18)
C(8)-C(9)	1.3968(19)	C(8)-H(8)	0.952(16)
C(9)-C(10)	1.3898(18)	C(9)-C(13)	1.4660(18)
C(10)-C(11)	1.3816(18)	C(10)-H(10)	0.973(16)
C(11)-H(11)	0.967(16)	C(12)-H(12C)	0.991(19)
C(12)-H(12B)	0.990(18)	C(12)-H(12A)	1.021(19)
C(13)-H(13)	1.006(17)		
C(1)#1-O(1)-C(1)	113.56(16)	C(5)-O(2)-C(4)	111.11(10)
C(7)-O(3)-C(12)	116.69(11)	C(6)-N(1)-C(2)	118.97(11)
C(6)-N(1)-C(3)	120.77(11)	C(2)-N(1)-C(3)	114.82(10)
O(1)-C(1)-C(2)	110.55(10)	O(1)-C(1)-H(1B)	111.9(9)
C(2)-C(1)-H(1B)	108.5(9)	O(1)-C(1)-H(1A)	105.4(10)
C(2)-C(1)-H(1A)	110.4(10)	H(1B)-C(1)-H(1A)	110.1(13)
N(1)-C(2)-C(1)	111.76(11)	N(1)-C(2)-H(2B)	108.0(9)
C(1)-C(2)-H(2B)	107.2(9)	N(1)-C(2)-H(2A)	112.4(8)
C(1)-C(2)-H(2A)	109.8(9)	H(2B)-C(2)-H(2A)	107.5(12)
N(1)-C(3)-C(4)	114.20(12)	N(1)-C(3)-H(3B)	109.5(9)
C(4)-C(3)-H(3B)	108.5(9)	N(1)-C(3)-H(3A)	108.3(9)
C(4)-C(3)-H(3A)	107.8(9)	H(3B)-C(3)-H(3A)	108.4(13)
O(2)-C(4)-C(3)	109.42(11)	O(2)-C(4)-H(4B)	110.0(9)
C(3)-C(4)-H(4B)	110.2(9)	O(2)-C(4)-H(4A)	109.6(9)
C(3)-C(4)-H(4A)	109.5(10)	H(4B)-C(4)-H(4A)	108.1(13)
O(2)-C(5)-C(5)#1	110.02(11)	O(2)-C(5)-H(5B)	109.8(10)
C(5)#1-C(5)-H(5B)	110.8(10)	O(2)-C(5)-H(5A)	107.7(10)
C(5)#1-C(5)-H(5A)	108.3(9)	H(5B)-C(5)-H(5A)	110.2(14)
N(1)-C(6)-C(11)	122.13(11)	N(1)-C(6)-C(7)	121.29(12)
C(11)-C(6)-C(7)	116.54(11)	O(3)-C(7)-C(8)	122.75(11)
O(3)-C(7)-C(6)	116.47(11)	C(8)-C(7)-C(6)	120.73(12)
C(7)-C(8)-C(9)	121.34(12)	C(7)-C(8)-H(8)	120.2(10)
C(9)-C(8)-H(8)	118.4(10)	C(10)-C(9)-C(8)	118.77(12)
C(10)-C(9)-C(13)	123.39(13)	C(8)-C(9)-C(13)	117.75(12)
C(11)-C(10)-C(9)	120.27(13)	C(11)-C(10)-H(10)	119.3(9)
C(9)-C(10)-H(10)	120.5(9)	C(10)-C(11)-C(6)	122.28(12)
C(10)-C(11)-H(11)	119.5(9)	C(6)-C(11)-H(11)	118.2(9)
O(3)-C(12)-H(12C)	106.2(10)	O(3)-C(12)-H(12B)	110.1(10)
H(12C)-C(12)-H(12B)	110.2(14)	O(3)-C(12)-H(12A)	110.0(11)
H(12C)-C(12)-H(12A)	113.0(15)	H(12B)-C(12)-H(12A)	107.4(14)
O(4)-C(13)-C(9)	126.64(13)	O(4)-C(13)-H(13)	120.3(10)
C(9)-C(13)-H(13)	113.1(10)		

7.1.2 Röntgenkristallstruktur von Verbindung 7a

Verbindung	7a		
Kürzel	FO5637		
Farbe	weiß	P _{ber.} [g/cm ³]	1,483
Summenformel	C ₅₅ H ₇₄ F ₁₂ N ₄ NaO ₁₅ P ₂	Absorptions-Koeffizient μ [cm ⁻¹]	1,9
M _R	1367,1	Zahl der gemessenen Reflexe	84595
Messtemperatur [°C]	-140(2)	symmetrieunabhängige Reflexe	13900
Kristallsystem	orthorhombisch	Vollständigkeit Θ_{\max} [%]	99,6
Raumgruppe	PBca	Beobachtete Reflexe	13900
Gitterparameter a [Å]	14,1722(2)	Messbereich Θ [°]	1,89< Θ <27,42
b [Å]	26,0526(4)	Anzahl der verfeinerten Parameter	1107
c [Å]	33,1615(5)	R1 _{obs}	0,0495
α [°]	90,00	R2 _{obs}	0,1125
β [°]	90,00	R1 _{all}	0,0577
γ [°]	90,00	wR2 _{all}	0,1177
Elementarzellenvolumen V [Å ³]	12244,0(3)	GOF	1,098
Kristallgröße [mm ³]	0,054x0,052x0,048	Restelektronendichte [e Å ³]	0,564 / -0,714
Moleküle pro Elementarzelle Z	8	P _{ber.} [g/cm ³]	1,483

Verbindung 7a: Bindungslängen (Å) und Winkel (°)

Na(1)-O(3)	2.4292(15)	Na(1)-O(1)	2.4459(15)
Na(1)-O(14)	2.4601(15)	Na(1)-O(6)	2.5861(15)
Na(1)-O(2)	2.5873(16)	Na(1)-O(4)	2.5939(15)
Na(1)-N(1)	2.7752(17)	Na(1)-N(2)	2.8584(17)
Na(2)-O(8)	2.4480(15)	Na(2)-O(7)	2.5152(15)
Na(2)-O(9)	2.5168(16)	Na(2)-O(11)	2.5324(15)
Na(2)-O(10)	2.5325(16)	Na(2)-O(13)	2.6970(15)
Na(2)-N(4)	2.7227(18)	Na(2)-N(3)	2.8060(17)
O(1)-C(3)	1.433(2)	O(1)-C(2)	1.435(2)
O(2)-C(7)	1.423(2)	O(2)-C(6)	1.424(2)
O(3)-C(9)	1.431(2)	O(3)-C(8)	1.431(2)
O(4)-C(12)	1.376(2)	O(4)-C(17)	1.446(2)
O(5)-C(18)	1.211(3)	O(6)-C(19)	1.377(2)
O(6)-C(25)	1.435(2)	O(7)-C(26)	1.220(2)
O(8)-C(28)	1.435(2)	O(8)-C(29)	1.440(2)
O(9)-C(32)	1.433(2)	O(9)-C(33)	1.434(2)
O(10)-C(34)	1.422(2)	O(10)-C(35)	1.431(2)
O(11)-C(38)	1.378(2)	O(11)-C(43)	1.444(2)
O(12)-C(44)	1.208(3)	O(13)-C(46)	1.376(2)
O(13)-C(51)	1.434(3)	O(14)-C(52)	1.220(2)
N(1)-C(11)	1.435(2)	N(1)-C(1)	1.480(2)
N(1)-C(10)	1.490(3)	N(2)-C(24)	1.419(2)
N(2)-C(5)	1.470(2)	N(2)-C(4)	1.484(2)
N(3)-C(45)	1.421(2)	N(3)-C(36)	1.473(2)
N(3)-C(27)	1.484(3)	N(4)-C(37)	1.449(2)
N(4)-C(31)	1.478(3)	N(4)-C(30)	1.485(3)
C(1)-C(2)	1.520(3)	C(1)-H(1B)	0.97(3)
C(1)-H(1A)	0.97(2)	C(2)-H(2B)	0.99(2)
C(2)-H(2A)	0.98(2)	C(3)-C(4)	1.519(3)
C(3)-H(3B)	0.97(2)	C(3)-H(3A)	0.99(2)
C(4)-H(4B)	0.99(2)	C(4)-H(4A)	0.94(2)
C(5)-C(6)	1.510(3)	C(5)-H(5B)	0.94(2)
C(5)-H(5A)	0.98(2)	C(6)-H(6B)	1.00(2)
C(6)-H(6A)	0.96(2)	C(7)-C(8)	1.505(3)
C(7)-H(7B)	0.99(2)	C(7)-H(7A)	0.98(2)
C(8)-H(8B)	0.98(3)	C(8)-H(8A)	1.00(2)
C(9)-C(10)	1.513(3)	C(9)-H(9B)	0.98(2)
C(9)-H(9A)	0.98(3)	C(10)-H(10B)	0.97(2)
C(10)-H(10A)	0.97(2)	C(11)-C(16)	1.392(3)
C(11)-C(12)	1.414(3)	C(12)-C(13)	1.384(3)
C(13)-C(14)	1.406(3)	C(13)-H(13)	0.91(2)
C(14)-C(15)	1.392(3)	C(14)-C(18)	1.478(3)
C(15)-C(16)	1.392(3)	C(15)-H(15)	0.96(3)
C(16)-H(16)	0.94(3)	C(17)-H(17C)	0.93(2)
C(17)-H(17B)	1.02(3)	C(17)-H(17A)	1.00(2)
C(18)-H(18)	0.97(3)	C(19)-C(20)	1.386(3)
C(19)-C(24)	1.425(2)	C(20)-C(21)	1.406(3)
C(20)-H(20)	0.95(2)	C(21)-C(22)	1.393(3)
C(21)-C(26)	1.472(3)	C(22)-C(23)	1.391(3)
C(22)-H(22)	0.93(2)	C(23)-C(24)	1.401(3)
C(23)-H(23)	0.94(2)	C(25)-H(25C)	0.99(2)
C(25)-H(25B)	0.98(3)	C(25)-H(25A)	1.00(3)
C(26)-H(26)	1.05(2)	C(27)-C(28)	1.509(3)
C(27)-H(27B)	0.97(2)	C(27)-H(27A)	0.98(2)
C(28)-H(28B)	1.00(2)	C(28)-H(28A)	0.99(3)

C(29)-C(30)	1.512(3)	C(29)-H(29B)	1.00(3)
C(29)-H(29A)	1.02(3)	C(30)-H(30B)	1.01(3)
C(30)-H(30A)	0.98(2)	C(31)-C(32)	1.506(3)
C(31)-H(31B)	0.99(2)	C(31)-H(31A)	1.04(3)
C(32)-H(32B)	0.99(2)	C(32)-H(32A)	0.99(3)
C(33)-C(34)	1.507(3)	C(33)-H(33B)	0.98(2)
C(33)-H(33A)	0.99(2)	C(34)-H(34B)	1.00(2)
C(34)-H(34A)	1.00(3)	C(35)-C(36)	1.511(3)
C(35)-H(35B)	1.01(2)	C(35)-H(35A)	0.99(2)
C(36)-H(36A)	1.03(2)	C(36)-H(36B)	0.96(2)
C(37)-C(42)	1.396(3)	C(37)-C(38)	1.413(3)
C(38)-C(39)	1.391(3)	C(39)-C(40)	1.399(3)
C(39)-H(39)	0.94(2)	C(40)-C(41)	1.391(3)
C(40)-C(44)	1.484(3)	C(41)-C(42)	1.391(3)
C(41)-H(41)	0.94(2)	C(42)-H(42)	0.96(3)
C(43)-H(43C)	0.98(2)	C(43)-H(43B)	0.93(2)
C(43)-H(43A)	1.00(3)	C(44)-H(44)	0.94(3)
C(45)-C(50)	1.400(3)	C(45)-C(46)	1.424(3)
C(46)-C(47)	1.384(3)	C(47)-C(48)	1.405(3)
C(47)-H(47)	0.95(2)	C(48)-C(49)	1.388(3)
C(48)-C(52)	1.472(2)	C(49)-C(50)	1.386(3)
C(49)-H(49)	0.96(2)	C(50)-H(50)	0.95(2)
C(51)-H(51C)	0.99(3)	C(51)-H(51B)	0.95(3)
C(51)-H(51A)	1.03(3)	C(52)-H(52)	1.01(2)
P(1)-F(11)	1.5888(16)	P(1)-F(14)	1.5899(15)
P(1)-F(12)	1.5964(15)	P(1)-F(15)	1.5982(15)
P(1)-F(16)	1.5989(14)	P(1)-F(13)	1.6014(15)
P(2)-F(25)	1.5786(15)	P(2)-F(22)	1.5829(18)
P(2)-F(21)	1.5881(16)	P(2)-F(24)	1.5987(16)
P(2)-F(23)	1.6023(18)	P(2)-F(26)	1.6089(14)
O(1A)-C(2A)	1.216(3)	C(1A)-C(2A)	1.497(4)
C(1A)-H(1AC)	1.04(3)	C(1A)-H(1AB)	1.09(4)
C(1A)-H(1AA)	1.05(4)	C(2A)-C(3A)	1.504(3)
C(3A)-H(3AC)	1.02(3)	C(3A)-H(3AB)	0.99(3)
C(3A)-H(3AA)	1.01(4)		
O(3)-Na(1)-O(1)	100.55(5)	O(3)-Na(1)-O(14)	99.17(5)
O(1)-Na(1)-O(14)	153.82(6)	O(3)-Na(1)-O(6)	173.04(5)
O(1)-Na(1)-O(6)	77.03(5)	O(14)-Na(1)-O(6)	85.17(5)
O(3)-Na(1)-O(2)	65.97(5)	O(1)-Na(1)-O(2)	91.28(5)
O(14)-Na(1)-O(2)	81.21(5)	O(6)-Na(1)-O(2)	120.34(5)
O(3)-Na(1)-O(4)	90.21(5)	O(1)-Na(1)-O(4)	115.05(5)
O(14)-Na(1)-O(4)	81.82(5)	O(6)-Na(1)-O(4)	85.01(5)
O(2)-Na(1)-O(4)	147.89(5)	O(3)-Na(1)-N(1)	67.72(5)
O(1)-Na(1)-N(1)	66.07(5)	O(14)-Na(1)-N(1)	138.39(5)
O(6)-Na(1)-N(1)	105.44(5)	O(2)-Na(1)-N(1)	122.64(5)
O(4)-Na(1)-N(1)	59.87(5)	O(3)-Na(1)-N(2)	126.21(5)
O(1)-Na(1)-N(2)	67.89(5)	O(14)-Na(1)-N(2)	86.56(5)
O(6)-Na(1)-N(2)	59.18(4)	O(2)-Na(1)-N(2)	62.21(5)
O(4)-Na(1)-N(2)	143.18(5)	N(1)-Na(1)-N(2)	133.74(5)
O(8)-Na(2)-O(7)	153.13(6)	O(8)-Na(2)-O(9)	118.27(5)
O(7)-Na(2)-O(9)	86.07(5)	O(8)-Na(2)-O(11)	104.15(5)
O(7)-Na(2)-O(11)	84.73(5)	O(9)-Na(2)-O(11)	92.27(5)
O(8)-Na(2)-O(10)	96.95(5)	O(7)-Na(2)-O(10)	81.67(5)
O(9)-Na(2)-O(10)	66.93(5)	O(11)-Na(2)-O(10)	155.76(6)
O(8)-Na(2)-O(13)	75.25(5)	O(7)-Na(2)-O(13)	82.44(5)
O(9)-Na(2)-O(13)	164.74(5)	O(11)-Na(2)-O(13)	76.74(5)
O(10)-Na(2)-O(13)	120.85(5)	O(8)-Na(2)-N(4)	68.34(5)
O(7)-Na(2)-N(4)	136.12(6)	O(9)-Na(2)-N(4)	68.40(5)

O(11)-Na(2)-N(4)	62.34(5)	O(10)-Na(2)-N(4)	116.64(5)
O(13)-Na(2)-N(4)	114.05(5)	O(8)-Na(2)-N(3)	67.23(5)
O(7)-Na(2)-N(3)	88.49(5)	O(9)-Na(2)-N(3)	131.22(5)
O(11)-Na(2)-N(3)	135.39(5)	O(10)-Na(2)-N(3)	64.32(5)
O(13)-Na(2)-N(3)	58.66(5)	N(4)-Na(2)-N(3)	135.22(6)
C(3)-O(1)-C(2)	110.95(14)	C(3)-O(1)-Na(1)	116.98(11)
C(2)-O(1)-Na(1)	106.02(11)	C(7)-O(2)-C(6)	113.40(15)
C(7)-O(2)-Na(1)	103.79(11)	C(6)-O(2)-Na(1)	114.15(11)
C(9)-O(3)-C(8)	111.01(15)	C(9)-O(3)-Na(1)	121.59(12)
C(8)-O(3)-Na(1)	118.80(12)	C(12)-O(4)-C(17)	115.86(15)
C(12)-O(4)-Na(1)	118.44(11)	C(17)-O(4)-Na(1)	122.23(11)
C(19)-O(6)-C(25)	116.90(15)	C(19)-O(6)-Na(1)	108.16(10)
C(25)-O(6)-Na(1)	119.62(12)	C(26)-O(7)-Na(2)	147.66(13)
C(28)-O(8)-C(29)	110.47(14)	C(28)-O(8)-Na(2)	118.32(12)
C(29)-O(8)-Na(2)	114.05(12)	C(32)-O(9)-C(33)	111.79(15)
C(32)-O(9)-Na(2)	114.61(12)	C(33)-O(9)-Na(2)	113.96(11)
C(34)-O(10)-C(35)	112.39(16)	C(34)-O(10)-Na(2)	110.08(12)
C(35)-O(10)-Na(2)	115.79(11)	C(38)-O(11)-C(43)	116.40(15)
C(38)-O(11)-Na(2)	126.30(11)	C(43)-O(11)-Na(2)	116.88(11)
C(46)-O(13)-C(51)	117.37(15)	C(46)-O(13)-Na(2)	106.97(11)
C(51)-O(13)-Na(2)	132.67(13)	C(52)-O(14)-Na(1)	157.03(13)
C(11)-N(1)-C(1)	114.99(16)	C(11)-N(1)-C(10)	108.91(15)
C(1)-N(1)-C(10)	114.06(16)	C(11)-N(1)-Na(1)	109.77(11)
C(1)-N(1)-Na(1)	106.43(11)	C(10)-N(1)-Na(1)	101.77(11)
C(24)-N(2)-C(5)	116.32(15)	C(24)-N(2)-C(4)	116.26(15)
C(5)-N(2)-C(4)	112.91(15)	C(24)-N(2)-Na(1)	97.44(10)
C(5)-N(2)-Na(1)	110.29(11)	C(4)-N(2)-Na(1)	101.00(11)
C(45)-N(3)-C(36)	116.00(16)	C(45)-N(3)-C(27)	114.86(15)
C(36)-N(3)-C(27)	111.56(15)	C(45)-N(3)-Na(2)	99.99(11)
C(36)-N(3)-Na(2)	108.73(11)	C(27)-N(3)-Na(2)	104.10(11)
C(37)-N(4)-C(31)	111.52(16)	C(37)-N(4)-C(30)	109.41(15)
C(31)-N(4)-C(30)	112.03(16)	C(37)-N(4)-Na(2)	115.17(11)
C(31)-N(4)-Na(2)	102.63(11)	C(30)-N(4)-Na(2)	105.86(12)
N(1)-C(1)-C(2)	112.85(16)	N(1)-C(1)-H(1B)	109.3(14)
C(2)-C(1)-H(1B)	106.8(14)	N(1)-C(1)-H(1A)	111.5(14)
C(2)-C(1)-H(1A)	109.6(14)	H(1B)-C(1)-H(1A)	106.5(19)
O(1)-C(2)-C(1)	108.24(16)	O(1)-C(2)-H(2B)	109.9(13)
C(1)-C(2)-H(2B)	113.1(13)	O(1)-C(2)-H(2A)	109.8(14)
C(1)-C(2)-H(2A)	108.8(14)	H(2B)-C(2)-H(2A)	107.0(18)
O(1)-C(3)-C(4)	109.95(15)	O(1)-C(3)-H(3B)	108.3(13)
C(4)-C(3)-H(3B)	112.4(13)	O(1)-C(3)-H(3A)	109.1(12)
C(4)-C(3)-H(3A)	107.9(12)	H(3B)-C(3)-H(3A)	109.0(18)
N(2)-C(4)-C(3)	112.52(16)	N(2)-C(4)-H(4B)	111.3(13)
C(3)-C(4)-H(4B)	107.3(13)	N(2)-C(4)-H(4A)	109.6(13)
C(3)-C(4)-H(4A)	110.5(13)	H(4B)-C(4)-H(4A)	105.3(19)
N(2)-C(5)-C(6)	110.78(15)	N(2)-C(5)-H(5B)	107.9(13)
C(6)-C(5)-H(5B)	108.2(13)	N(2)-C(5)-H(5A)	114.0(13)
C(6)-C(5)-H(5A)	111.1(13)	H(5B)-C(5)-H(5A)	104.3(18)
O(2)-C(6)-C(5)	106.07(15)	O(2)-C(6)-H(6B)	110.0(13)
C(5)-C(6)-H(6B)	112.5(13)	O(2)-C(6)-H(6A)	113.4(13)
C(5)-C(6)-H(6A)	109.7(13)	H(6B)-C(6)-H(6A)	105.2(17)
O(2)-C(7)-C(8)	106.86(17)	O(2)-C(7)-H(7B)	109.9(13)
C(8)-C(7)-H(7B)	109.6(13)	O(2)-C(7)-H(7A)	109.4(14)
C(8)-C(7)-H(7A)	111.9(14)	H(7B)-C(7)-H(7A)	109.1(18)
O(3)-C(8)-C(7)	108.49(16)	O(3)-C(8)-H(8B)	110.2(14)
C(7)-C(8)-H(8B)	109.0(14)	O(3)-C(8)-H(8A)	108.9(13)
C(7)-C(8)-H(8A)	110.0(13)	H(8B)-C(8)-H(8A)	110.2(19)
O(3)-C(9)-C(10)	108.78(16)	O(3)-C(9)-H(9B)	111.2(14)
C(10)-C(9)-H(9B)	108.6(14)	O(3)-C(9)-H(9A)	111.0(14)

C(10)-C(9)-H(9A)	112.6(14)	H(9B)-C(9)-H(9A)	105(2)
N(1)-C(10)-C(9)	114.59(17)	N(1)-C(10)-H(10B)	111.3(15)
C(9)-C(10)-H(10B)	108.3(14)	N(1)-C(10)-H(10A)	107.7(13)
C(9)-C(10)-H(10A)	108.8(13)	H(10B)-C(10)-H(10A)	105.8(19)
C(16)-C(11)-C(12)	118.24(18)	C(16)-C(11)-N(1)	123.85(17)
C(12)-C(11)-N(1)	117.89(16)	O(4)-C(12)-C(13)	123.44(17)
O(4)-C(12)-C(11)	115.74(17)	C(13)-C(12)-C(11)	120.81(17)
C(12)-C(13)-C(14)	119.98(18)	C(12)-C(13)-H(13)	119.3(14)
C(14)-C(13)-H(13)	120.8(14)	C(15)-C(14)-C(13)	119.63(19)
C(15)-C(14)-C(18)	120.09(19)	C(13)-C(14)-C(18)	120.26(19)
C(16)-C(15)-C(14)	120.01(19)	C(16)-C(15)-H(15)	121.1(15)
C(14)-C(15)-H(15)	118.6(15)	C(15)-C(16)-C(11)	121.31(19)
C(15)-C(16)-H(16)	118.8(15)	C(11)-C(16)-H(16)	119.9(15)
O(4)-C(17)-H(17C)	106.2(14)	O(4)-C(17)-H(17B)	110.3(14)
H(17C)-C(17)-H(17B)	109(2)	O(4)-C(17)-H(17A)	111.1(14)
H(17C)-C(17)-H(17A)	108.2(19)	H(17B)-C(17)-H(17A)	111.6(19)
O(5)-C(18)-C(14)	124.6(2)	O(5)-C(18)-H(18)	123.0(16)
C(14)-C(18)-H(18)	112.4(16)	O(6)-C(19)-C(20)	124.03(16)
O(6)-C(19)-C(24)	115.26(15)	C(20)-C(19)-C(24)	120.63(16)
C(19)-C(20)-C(21)	119.95(17)	C(19)-C(20)-H(20)	120.3(14)
C(21)-C(20)-H(20)	119.7(14)	C(22)-C(21)-C(20)	120.02(17)
C(22)-C(21)-C(26)	121.31(17)	C(20)-C(21)-C(26)	118.52(17)
C(23)-C(22)-C(21)	119.81(17)	C(23)-C(22)-H(22)	119.2(14)
C(21)-C(22)-H(22)	121.0(14)	C(22)-C(23)-C(24)	121.49(17)
C(22)-C(23)-H(23)	119.0(14)	C(24)-C(23)-H(23)	119.4(14)
C(23)-C(24)-N(2)	123.22(16)	C(23)-C(24)-C(19)	117.82(16)
N(2)-C(24)-C(19)	118.81(16)	O(6)-C(25)-H(25C)	104.5(14)
O(6)-C(25)-H(25B)	109.8(16)	H(25C)-C(25)-H(25B)	110(2)
O(6)-C(25)-H(25A)	112.3(16)	H(25C)-C(25)-H(25A)	109(2)
H(25B)-C(25)-H(25A)	111(2)	O(7)-C(26)-C(21)	125.33(18)
O(7)-C(26)-H(26)	121.3(12)	C(21)-C(26)-H(26)	113.4(12)
N(3)-C(27)-C(28)	112.59(16)	N(3)-C(27)-H(27B)	108.0(13)
C(28)-C(27)-H(27B)	108.4(13)	N(3)-C(27)-H(27A)	109.1(14)
C(28)-C(27)-H(27A)	111.2(14)	H(27B)-C(27)-H(27A)	107.3(19)
O(8)-C(28)-C(27)	109.80(15)	O(8)-C(28)-H(28B)	108.1(13)
C(27)-C(28)-H(28B)	112.8(13)	O(8)-C(28)-H(28A)	109.1(15)
C(27)-C(28)-H(28A)	107.4(15)	H(28B)-C(28)-H(28A)	109.7(19)
O(8)-C(29)-C(30)	108.21(16)	O(8)-C(29)-H(29B)	107.9(15)
C(30)-C(29)-H(29B)	108.9(15)	O(8)-C(29)-H(29A)	110.5(14)
C(30)-C(29)-H(29A)	111.2(14)	H(29B)-C(29)-H(29A)	110(2)
N(4)-C(30)-C(29)	112.76(17)	N(4)-C(30)-H(30B)	112.4(14)
C(29)-C(30)-H(30B)	108.5(14)	N(4)-C(30)-H(30A)	107.7(13)
C(29)-C(30)-H(30A)	108.1(13)	H(30B)-C(30)-H(30A)	107.2(19)
N(4)-C(31)-C(32)	110.51(16)	N(4)-C(31)-H(31B)	108.2(13)
C(32)-C(31)-H(31B)	109.8(13)	N(4)-C(31)-H(31A)	114.8(14)
C(32)-C(31)-H(31A)	107.6(15)	H(31B)-C(31)-H(31A)	105.7(19)
O(9)-C(32)-C(31)	111.50(17)	O(9)-C(32)-H(32B)	108.9(14)
C(31)-C(32)-H(32B)	111.8(14)	O(9)-C(32)-H(32A)	107.3(14)
C(31)-C(32)-H(32A)	109.0(14)	H(32B)-C(32)-H(32A)	108(2)
O(9)-C(33)-C(34)	107.91(16)	O(9)-C(33)-H(33B)	110.7(14)
C(34)-C(33)-H(33B)	108.6(14)	O(9)-C(33)-H(33A)	109.8(13)
C(34)-C(33)-H(33A)	108.9(13)	H(33B)-C(33)-H(33A)	110.9(19)
O(10)-C(34)-C(33)	107.28(17)	O(10)-C(34)-H(34B)	110.8(14)
C(33)-C(34)-H(34B)	112.1(13)	O(10)-C(34)-H(34A)	111.0(14)
C(33)-C(34)-H(34A)	109.6(14)	H(34B)-C(34)-H(34A)	106.1(19)
O(10)-C(35)-C(36)	106.83(16)	O(10)-C(35)-H(35B)	108.6(13)
C(36)-C(35)-H(35B)	113.0(13)	O(10)-C(35)-H(35A)	110.0(13)
C(36)-C(35)-H(35A)	111.5(14)	H(35B)-C(35)-H(35A)	106.9(18)
N(3)-C(36)-C(35)	111.37(16)	N(3)-C(36)-H(36A)	112.5(13)

C(35)-C(36)-H(36A)	110.0(13)	N(3)-C(36)-H(36B)	107.3(14)
C(35)-C(36)-H(36B)	107.7(14)	H(36A)-C(36)-H(36B)	107.8(18)
C(42)-C(37)-C(38)	118.78(18)	C(42)-C(37)-N(4)	121.98(17)
C(38)-C(37)-N(4)	119.22(16)	O(11)-C(38)-C(39)	124.00(16)
O(11)-C(38)-C(37)	116.00(16)	C(39)-C(38)-C(37)	120.00(17)
C(38)-C(39)-C(40)	119.95(18)	C(38)-C(39)-H(39)	120.5(14)
C(40)-C(39)-H(39)	119.5(14)	C(41)-C(40)-C(39)	120.71(18)
C(41)-C(40)-C(44)	119.08(19)	C(39)-C(40)-C(44)	120.21(19)
C(40)-C(41)-C(42)	119.09(19)	C(40)-C(41)-H(41)	121.6(15)
C(42)-C(41)-H(41)	119.3(15)	C(41)-C(42)-C(37)	121.46(19)
C(41)-C(42)-H(42)	120.0(16)	C(37)-C(42)-H(42)	118.5(16)
O(11)-C(43)-H(43C)	109.2(13)	O(11)-C(43)-H(43B)	105.0(14)
H(43C)-C(43)-H(43B)	111.5(19)	O(11)-C(43)-H(43A)	110.0(14)
H(43C)-C(43)-H(43A)	111.2(19)	H(43B)-C(43)-H(43A)	109.8(19)
O(12)-C(44)-C(40)	125.1(2)	O(12)-C(44)-H(44)	120.5(16)
C(40)-C(44)-H(44)	114.4(16)	C(50)-C(45)-N(3)	123.54(17)
C(50)-C(45)-C(46)	118.05(16)	N(3)-C(45)-C(46)	118.29(17)
O(13)-C(46)-C(47)	123.72(17)	O(13)-C(46)-C(45)	115.68(16)
C(47)-C(46)-C(45)	120.46(17)	C(46)-C(47)-C(48)	120.02(17)
C(46)-C(47)-H(47)	120.1(14)	C(48)-C(47)-H(47)	119.8(14)
C(49)-C(48)-C(47)	119.71(17)	C(49)-C(48)-C(52)	121.07(17)
C(47)-C(48)-C(52)	119.13(17)	C(50)-C(49)-C(48)	120.39(18)
C(50)-C(49)-H(49)	119.5(14)	C(48)-C(49)-H(49)	120.1(14)
C(49)-C(50)-C(45)	121.06(18)	C(49)-C(50)-H(50)	118.8(14)
C(45)-C(50)-H(50)	120.1(14)	O(13)-C(51)-H(51C)	105.1(15)
O(13)-C(51)-H(51B)	109.3(17)	H(51C)-C(51)-H(51B)	109(2)
O(13)-C(51)-H(51A)	112.4(15)	H(51C)-C(51)-H(51A)	104(2)
H(51B)-C(51)-H(51A)	117(2)	O(14)-C(52)-C(48)	125.06(18)
O(14)-C(52)-H(52)	121.7(14)	C(48)-C(52)-H(52)	113.3(14)
F(11)-P(1)-F(14)	90.87(10)	F(11)-P(1)-F(12)	89.71(10)
F(14)-P(1)-F(12)	179.06(10)	F(11)-P(1)-F(15)	179.22(10)
F(14)-P(1)-F(15)	89.69(9)	F(12)-P(1)-F(15)	89.74(10)
F(11)-P(1)-F(16)	90.24(9)	F(14)-P(1)-F(16)	91.58(9)
F(12)-P(1)-F(16)	89.17(8)	F(15)-P(1)-F(16)	89.19(9)
F(11)-P(1)-F(13)	90.55(10)	F(14)-P(1)-F(13)	89.78(9)
F(12)-P(1)-F(13)	89.47(9)	F(15)-P(1)-F(13)	90.00(10)
F(16)-P(1)-F(13)	178.42(10)	F(25)-P(2)-F(22)	91.30(11)
F(25)-P(2)-F(21)	177.96(13)	F(22)-P(2)-F(21)	90.65(14)
F(25)-P(2)-F(24)	88.74(9)	F(22)-P(2)-F(24)	89.53(11)
F(21)-P(2)-F(24)	90.70(9)	F(25)-P(2)-F(23)	88.32(10)
F(22)-P(2)-F(23)	179.39(13)	F(21)-P(2)-F(23)	89.73(14)
F(24)-P(2)-F(23)	90.95(11)	F(25)-P(2)-F(26)	91.75(9)
F(22)-P(2)-F(26)	90.29(9)	F(21)-P(2)-F(26)	88.81(9)
F(24)-P(2)-F(26)	179.48(9)	F(23)-P(2)-F(26)	89.24(9)
C(2A)-C(1A)-H(1AC)	108.0(17)	C(2A)-C(1A)-H(1AB)	109(2)
H(1AC)-C(1A)-H(1AB)	106(3)	C(2A)-C(1A)-H(1AA)	103(2)
H(1AC)-C(1A)-H(1AA)	108(3)	H(1AB)-C(1A)-H(1AA)	122(3)
O(1A)-C(2A)-C(1A)	121.0(2)	O(1A)-C(2A)-C(3A)	121.9(2)
C(1A)-C(2A)-C(3A)	117.1(2)	C(2A)-C(3A)-H(3AC)	111.7(17)
C(2A)-C(3A)-H(3AB)	111.4(18)	H(3AC)-C(3A)-H(3AB)	111(2)
C(2A)-C(3A)-H(3AA)	108.6(19)	H(3AC)-C(3A)-H(3AA)	110(3)
H(3AB)-C(3A)-H(3AA)	104(3)		

7.1.3 Röntgenkristallstruktur von Verbindung 34

Verbindung	34		
Kürzel	FO5709		
Farbe	braun	P _{ber.} [g/cm ³]	1,361
Summenformel	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₆	Absorptions-Koeffizient μ [cm ⁻¹]	1,0
M _R	419,47	Zahl der gemessenen Reflexe	4486
Messtemperatur [°C]	-140(2)	symmetrieunabhängige Reflexe	4488
Kristallsystem	triklin	Vollständigkeit Θ_{\max} [%]	99,1
Raumgruppe	P1	Beobachtete Reflexe	4485
Gitterparameter a [Å]	7,5396(2)	Messbereich Θ [°]	2,46 < Θ < 27,10
b [Å]	11,1504(3)	Anzahl der verfeinerten Parameter	394
c [Å]	12,5650(4)	R _{1obs}	0,0481
α [°]	90,129(1)	R _{2obs}	0,1117
β [°]	94,493(1)	R _{1all}	0,0626
γ [°]	103,525(2)	wR _{2all}	0,1207
Elementarzellenvolumen V [Å ³]	1023,65(5)	GOF	1,058
Kristallgröße [mm ³]	0,042x0,038x0,036	Restelektronendichte [e Å ³]	0,317 / -0,270
Moleküle pro Elementarzelle Z	2	P _{ber.} [g/cm ³]	1,361

Verbindung 34: Bindungslängen (Å) und Winkel (°)

O(1)-C(2)	1.422(2)	O(1)-C(3)	1.423(2)
O(2)-C(6)	1.425(2)	O(2)-C(7)	1.427(2)
O(3)-C(8)	1.417(2)	O(3)-C(9)	1.423(2)
O(4)-C(11)	1.232(2)	O(5)-C(14)	1.231(2)
O(6)-C(21)	1.196(3)	O(6A)-C(21)	1.106(8)
N(1)-C(11)	1.350(2)	N(1)-C(1)	1.468(2)
N(1)-C(10)	1.471(3)	N(2)-C(14)	1.357(2)
N(2)-C(4)	1.472(2)	N(2)-C(5)	1.474(2)
N(3)-C(15)	1.377(2)	N(3)-C(13)	1.457(2)
N(3)-C(12)	1.463(2)	C(1)-C(2)	1.511(3)
C(1)-H(1B)	0.97(2)	C(1)-H(1A)	0.97(2)
C(2)-H(2B)	0.97(2)	C(2)-H(2A)	0.99(2)
C(3)-C(4)	1.513(3)	C(3)-H(3B)	0.97(2)
C(3)-H(3A)	1.02(2)	C(4)-H(4B)	1.01(2)
C(4)-H(4A)	0.98(2)	C(5)-C(6)	1.517(3)
C(5)-H(5B)	0.97(2)	C(5)-H(5A)	0.97(2)
C(6)-H(6B)	0.99(2)	C(6)-H(6A)	0.95(2)
C(7)-C(8)	1.499(3)	C(7)-H(7B)	0.95(2)
C(7)-H(7A)	1.00(2)	C(8)-H(8B)	1.00(2)
C(8)-H(8A)	0.98(2)	C(9)-C(10)	1.510(3)
C(9)-H(9B)	0.98(2)	C(9)-H(9A)	0.98(2)
C(10)-H(10B)	0.99(2)	C(10)-H(10A)	0.96(2)
C(11)-C(12)	1.533(3)	C(12)-H(12B)	0.99(2)
C(12)-H(12A)	0.97(2)	C(13)-C(14)	1.534(3)
C(13)-H(13B)	0.97(2)	C(13)-H(13A)	1.00(2)
C(15)-C(16)	1.413(3)	C(15)-C(20)	1.415(3)
C(16)-C(17)	1.383(3)	C(16)-H(16)	0.97(2)
C(17)-C(18)	1.390(3)	C(17)-H(17)	0.95(2)
C(18)-C(19)	1.400(3)	C(18)-C(21)	1.460(2)
C(19)-C(20)	1.377(3)	C(19)-H(19)	0.96(2)
C(20)-H(20)	0.98(2)	C(21)-H(21A)	0.9500
C(21)-H(21B)	0.9500		
C(2)-O(1)-C(3)	111.56(14)	C(6)-O(2)-C(7)	113.49(15)
C(8)-O(3)-C(9)	111.12(15)	C(11)-N(1)-C(1)	125.56(17)
C(11)-N(1)-C(10)	116.76(16)	C(1)-N(1)-C(10)	117.46(15)
C(14)-N(2)-C(4)	124.93(16)	C(14)-N(2)-C(5)	117.13(15)
C(4)-N(2)-C(5)	117.93(15)	C(15)-N(3)-C(13)	121.94(16)
C(15)-N(3)-C(12)	121.83(16)	C(13)-N(3)-C(12)	115.16(14)
N(1)-C(1)-C(2)	114.14(16)	N(1)-C(1)-H(1B)	106.9(12)
C(2)-C(1)-H(1B)	108.2(12)	N(1)-C(1)-H(1A)	109.1(13)
C(2)-C(1)-H(1A)	111.7(13)	H(1B)-C(1)-H(1A)	106.4(18)
O(1)-C(2)-C(1)	108.10(15)	O(1)-C(2)-H(2B)	110.7(13)
C(1)-C(2)-H(2B)	109.0(13)	O(1)-C(2)-H(2A)	108.5(13)
C(1)-C(2)-H(2A)	110.1(13)	H(2B)-C(2)-H(2A)	110.4(18)
O(1)-C(3)-C(4)	108.23(15)	O(1)-C(3)-H(3B)	110.4(13)
C(4)-C(3)-H(3B)	108.9(13)	O(1)-C(3)-H(3A)	109.5(13)
C(4)-C(3)-H(3A)	108.7(13)	H(3B)-C(3)-H(3A)	111.1(18)
N(2)-C(4)-C(3)	113.91(17)	N(2)-C(4)-H(4B)	106.8(12)
C(3)-C(4)-H(4B)	110.2(12)	N(2)-C(4)-H(4A)	108.8(13)
C(3)-C(4)-H(4A)	110.9(14)	H(4B)-C(4)-H(4A)	105.8(18)
N(2)-C(5)-C(6)	114.86(17)	N(2)-C(5)-H(5B)	111.6(12)
C(6)-C(5)-H(5B)	106.2(13)	N(2)-C(5)-H(5A)	107.9(13)
C(6)-C(5)-H(5A)	110.5(13)	H(5B)-C(5)-H(5A)	105.5(17)
O(2)-C(6)-C(5)	109.20(16)	O(2)-C(6)-H(6B)	111.2(12)

C(5)-C(6)-H(6B)	108.1(12)	O(2)-C(6)-H(6A)	110.0(14)
C(5)-C(6)-H(6A)	110.0(14)	H(6B)-C(6)-H(6A)	108.3(18)
O(2)-C(7)-C(8)	114.71(16)	O(2)-C(7)-H(7B)	103.8(13)
C(8)-C(7)-H(7B)	108.9(13)	O(2)-C(7)-H(7A)	108.4(13)
C(8)-C(7)-H(7A)	109.9(13)	H(7B)-C(7)-H(7A)	111.1(18)
O(3)-C(8)-C(7)	110.08(16)	O(3)-C(8)-H(8B)	109.8(13)
C(7)-C(8)-H(8B)	108.8(12)	O(3)-C(8)-H(8A)	109.6(13)
C(7)-C(8)-H(8A)	110.0(13)	H(8B)-C(8)-H(8A)	108.6(17)
O(3)-C(9)-C(10)	110.08(16)	O(3)-C(9)-H(9B)	108.8(13)
C(10)-C(9)-H(9B)	109.7(13)	O(3)-C(9)-H(9A)	107.4(13)
C(10)-C(9)-H(9A)	111.9(13)	H(9B)-C(9)-H(9A)	108.9(19)
N(1)-C(10)-C(9)	114.57(17)	N(1)-C(10)-H(10B)	107.2(13)
C(9)-C(10)-H(10B)	109.4(13)	N(1)-C(10)-H(10A)	109.0(13)
C(9)-C(10)-H(10A)	109.4(13)	H(10B)-C(10)-H(10A)	106.9(18)
O(4)-C(11)-N(1)	121.81(18)	O(4)-C(11)-C(12)	119.02(16)
N(1)-C(11)-C(12)	119.15(16)	N(3)-C(12)-C(11)	113.09(15)
N(3)-C(12)-H(12B)	109.9(13)	C(11)-C(12)-H(12B)	107.1(13)
N(3)-C(12)-H(12A)	106.9(12)	C(11)-C(12)-H(12A)	112.3(12)
H(12B)-C(12)-H(12A)	107.4(17)	N(3)-C(13)-C(14)	113.51(15)
N(3)-C(13)-H(13B)	106.6(12)	C(14)-C(13)-H(13B)	110.8(12)
N(3)-C(13)-H(13A)	110.5(13)	C(14)-C(13)-H(13A)	108.0(13)
H(13B)-C(13)-H(13A)	107.2(17)	O(5)-C(14)-N(2)	121.86(17)
O(5)-C(14)-C(13)	119.60(16)	N(2)-C(14)-C(13)	118.42(16)
N(3)-C(15)-C(16)	121.28(17)	N(3)-C(15)-C(20)	121.32(17)
C(16)-C(15)-C(20)	117.39(16)	C(17)-C(16)-C(15)	120.31(18)
C(17)-C(16)-H(16)	117.9(15)	C(15)-C(16)-H(16)	121.8(15)
C(16)-C(17)-C(18)	122.04(18)	C(16)-C(17)-H(17)	118.7(13)
C(18)-C(17)-H(17)	119.3(13)	C(17)-C(18)-C(19)	117.84(16)
C(17)-C(18)-C(21)	120.75(18)	C(19)-C(18)-C(21)	121.41(19)
C(20)-C(19)-C(18)	121.23(19)	C(20)-C(19)-H(19)	117.6(13)
C(18)-C(19)-H(19)	121.1(13)	C(19)-C(20)-C(15)	121.12(18)
C(19)-C(20)-H(20)	119.2(13)	C(15)-C(20)-H(20)	119.6(13)
O(6A)-C(21)-O(6)	101.7(4)	O(6A)-C(21)-C(18)	130.3(5)
O(6)-C(21)-C(18)	127.2(2)	O(6A)-C(21)-H(21A)	17.1
O(6)-C(21)-H(21A)	116.4	C(18)-C(21)-H(21A)	116.4
O(6A)-C(21)-H(21B)	114.9	O(6)-C(21)-H(21B)	16.0
C(18)-C(21)-H(21B)	114.9	H(21A)-C(21)-H(21B)	127.5

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema einer Zelle mit ausgewählten Ionenkanälen und Transportern.	1
Abb. 2: Schema eines Ionenindikators bzw. eines Fluoroionophors.	3
Abb. 3: Vergleich der Natriumionenindikatoren SBFI, Sodium Green, CoroNa Green, CoroNa Red, Asante NaTRIUM Green 1 und 2 für intrazelluläre Messungen.	6
Abb. 4: Strukturen natürlicher Ionophore.	7
Abb. 5: Erste Synthese eines Kronenethers.	8
Abb. 6: Lösungsmittelabhängigkeit der [18]Krone-6 Struktur.	9
Abb. 7: Einfluss verschiedener Donoratome in [18]Krone-6 auf die Komplexbildungskonstanten mit Kalium- und Silberionen.	10
Abb. 8: Dekadischer Logarithmus der Komplexbildungskonstanten von Na^+ und K^+ mit Kronenethern verschiedener Ringgröße (Abbildung modifiziert nach Steed und Atwood). ²¹	10
Abb. 9: Strukturen und in Wasser gemessene Dissoziationskonstanten einiger Kronenetherstrukturen für Natrium- und Kaliumionen.	12
Abb. 10: Strukturen der [16]Krone-5 Derivate nach Suzuki mit unterschiedlichen Natrium-Kalium-Selektivitäten.	13
Abb. 11: Allgemeine Synthese der Calixarene aus Phenolderivaten und Formaldehyd.	14
Abb. 12: Verschiedene Kryptanden mit Nomenklatur.	15
Abb. 13: Darstellung der Komplexstabilitätskonstanten verschiedener Kryptanden mit verschiedenen Alkaliionen (Abbildung modifiziert nach Steed und Atwood). ²¹	16
Abb. 14: Prinzip und Funktionsweise des PET-Mechanismus (Abbildung modifiziert nach Valeur und Leray). ⁷	18
Abb. 15: Prinzip und Funktionsweise des PCT-Mechanismus (Abbildung modifiziert nach Valeur und Leray). ⁷	19
Abb. 16: Zielstrukturen der Arbeit mit R = Fluorophor.	21
Abb. 17: Synthese der Ionophors 7 aus 5 und 4-Fluor-3-methoxybenzaldehyd.	23
Abb. 18: Kristallstruktur der Verbindung 7; ausgewählte Bindungsabstände [Å] und Winkel [°]:	24
Abb. 19: Kristallstruktur von 7a mit NaPF_6 ; ausgewählte Bindungsabstände [Å] und Winkel [°]:	24
Abb. 20: Allgemeine Synthese der Xanthene aus Aldehyden und Phenolderivaten.	25
Abb. 21: Reaktion von 7 mit 4-Fluorresorcinol und 4-Chlorresorcinol zum entsprechenden TPMF und Oxidation zu 9 und 11.	26

Abb. 22: Synthese von 12 und 13 aus 7 und Resorcinol.	27
Abb. 23: Methylierung der Indikatoren 12 und 13 mit Diazomethan und MeI.	28
Abb. 24: Reaktion des Xanthenderivates 13 mit <i>tert</i> -Butylbromacetat zu 16 mit anschließender Esterspaltung zu Derivat 17.	29
Abb. 25: Reaktion des Xanthenderivates 12 mit <i>tert</i> -Butylbromacetat zu 18 mit anschließender Esterspaltung zu Derivat 19.	30
Abb. 26: Synthese des Styrylderivates 21 aus 7 und 1,4- Dimethylpyridiniumiodid.	31
Abb. 27: Synthese der Styrylderivate 23 und 22 aus 7 und 2-(2,6-dimethyl-4H- pyran-4-yliden)-malononitril.	32
Abb. 28: Reaktion von 7 mit 24 und 3-Diethylaminophenol.	33
Abb. 29: Untersuchte Ionophor-7-basierende Farbstoffstrukturen.	35
Abb. 30: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von 13.	37
Abb. 31: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 13 von der Kaliumionenkonzentration und vom pH-Wert.	37
Abb. 32: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 13 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von TMACl.	38
Abb. 33: Zeitliche Abhängigkeit der Fluoreszenz.	39
Abb. 34: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 13 von der Natriumionenkonzentration.	40
Abb. 35: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 13 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von K.	40
Abb. 36: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von 12.	41
Abb. 37: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 12 von der Kaliumionenkonzentration und vom pH-Wert.	42
Abb. 38: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 12 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von TMACl.	42
Abb. 39: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 12 von der Natriumionenkonzentration.	43
Abb. 40: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 12 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von K ⁺	44
Abb. 41: Abhängigkeit der Fluoreszenzanregung von 12 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von K.	44
Abb. 42: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von 14.	45
Abb. 43: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von 15.	46

Abb. 44: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektrum von 19.	47
Abb. 45: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 19 von der Kaliumionenkonzentration und vom pH-Wert.	47
Abb. 46: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 19 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von TMACl.....	48
Abb. 47: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 19 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von Kalium.	49
Abb. 48: Abhängigkeit der Fluoreszenzanregung von 19 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von Kaliumionen.	49
Abb. 49: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektrum von 17.	50
Abb. 50: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 17 von der Kaliumionenkonzentration und vom pH-Wert.	51
Abb. 51: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 17 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von TMACl.....	51
Abb. 52: Abhängigkeit der Fluoreszenz von 17 von der Natriumionenkonzentration in Gegenwart von K.	52
Abb. 53: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von 23.	53
Abb. 54: UV-Vis- und Fluoreszenzemissionsspektren von 21.	53
Abb. 55: Strukturen der Natriumindikatoren 12,13, 19 und 17.....	54
Abb. 56: Allgemeine Synthesestrategien für die Kryptandsynthese:	59
Abb. 57: Synthese der Diaza-Kronenether 5 und 6.	60
Abb. 58: Umsatz von Anilin mit <i>tert</i> -Butylbromacetat zu 30 mit anschließender <i>Vilsmeier-Formylierung</i> zu 31.....	61
Abb. 59: Synthese von [2.1.1]-Derivat 34 aus 32 und Diaza-[15]Krone-5 37.....	61
Abb. 60: Kristallstruktur von 34; ausgewählte Bindungsabstände [Å] und Winkel [°]:.....	62
Abb. 61: Verschiedene Versuche, um Kryptandderivat 40 herzustellen.....	63
Abb. 62: Synthese von Kryptandderivat 40 aus 34 durch Hydrierung mit DIBAL und anschließender Oxidation mit <i>Dess-Martin-Periodan</i>	64
Abb. 63: Synthese des [2.1.1]-Xanthenderivates 42 aus 40 und Resorcinol.....	65
Abb. 64: Reaktion von 40 mit CH-aziden Verbindungen zu den [2.1.1]-Derivaten 43 und 45.	66
Abb. 65: Synthese des Kryptandrhaminderivates 48 aus 24 und 40.	67
Abb. 66: Synthese des Kryptand-Styrylfarbstoffderivates 49 aus dem [2.1.1]-Derivat 34.	68
Abb. 67: Reaktion von [2.1.1]-Derivat 34 mit Resorcinol zu 50, mit anschließender Hydrierung.	68

Abb. 68: Reaktionen von 34 mit 3-Aminophenolderivaten.....	69
Abb. 69: Synthese von 54 aus N-Tosyliminodiessigsäurechlorid 72 und Diaza-[15]Krone-5 5 bei verschiedenen Reaktionsbedingungen.	69
Abb. 70: Hydrierung und detosylierung von Kryptandderivat 54.	70
Abb. 71: Reaktion der Fmoc-geschützten Iminodiessigsäure 57 mit Diaza-[15]Krone-5 5.	71
Abb. 72: Synthese von Iminodiessigsäure-Styrylfarbstoff-Derivaten aus 31 und CH-aziden Verbindungen.....	72
Abb. 73: Untersuchte Kryptand-basierenden Farbstoffstrukturen.....	74
Abb. 74: UV-Vis-, Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von 42.	75
Abb. 75: Fluoreszenzänderung von 42 in Gegenwart von [2.2.1].	76
Abb. 76: Zielstrukturen der [16]Krone-5 basierenden Natriumindikatoren:	78
Abb. 77: Synthese von 1,1,2,2,8,8,9,9-Octamethyl-3,7-dioxanonan-1,9-diol 66 aus Pinacol und Malonaldehydbisdimethylacetal. ²⁶	79
Abb. 78: Synthese von N,O,O'-Tri(tolyl-4-sulfonyl)diethanolamin 69 aus Diethanolamin ⁶⁴ mit Reaktion des Boc geschützten Derivats zum Nebenprodukt 68.	80
Abb. 79: Reaktion von N,O,O'-Tri(tolyl-4-sulfonyl)diethanolamin 69 und 1,1,2,2,8,8,9,9-Octamethyl-3,7-dioxanonan-1,9-diol 66.	80
Abb. 80: Synthese von N-Tosyl-Iminodiessigsäure 71 aus Iminodiessigsäure, und Veresterung des Säurechlorids 72 mit 1,1,2,2,8,8,9,9-Octamethyl-3,7-dioxanonan-1,9-diol 66 zum 2,2,3,3,11,11,12,12-octamethyl-7-tosyl-1,4,10,13-tetraoxa-7-azacyclohexadecan-5,9-dion 73.....	81
Abb. 81: Synthese von Fluorphenyl-1,3-benzothiazolen 74 und 75 aus 2-Aminothiophenol.	82
Abb. 82: Untersuchte Ionophor-Farbstoff-Strukturen.	83
Abb. 83: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 13:	84
Abb. 84: Fluoreszenzmikroskopische Zeitserienaufnahmen von HEK-293 Zellen	85
Abb. 85: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von 12 in HEK-293 Zellen	86
Abb. 86: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 17:	87
Abb. 87: Fluoreszenzmikroskopische Zeitserienaufnahmen von HEK-293 Zellen	88
Abb. 88: Fluoreszenzmikroskopische Zeitserienaufnahmen von COS-7 Zellen.....	89
Abb. 89: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 19:	90
Abb. 90: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 14:	90
Abb. 91: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 15:	91
Abb. 92: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 23:	92
Abb. 93: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 42:	92

Abb. 94: Strukturen des Diaza-[15]Krone-5-Ionophors 7, der Diaza-[15]Krone-5-Xanthen-Derivate 12, 13, 19 und 17, des [2.1.1]-Ionophors 40 und des [2.1.1]-Xanthen-Derivats 42.	94
---	----

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vergleich der Ionendurchmesser und Innendurchmesser ausgewählter Kronenether (nach Steed und Atwood). ²¹	11
Tab. 2: Eigenschaften der Natriumindikatoren 13, 12, 19 und 17, SG (Sodium Green) ^{9, 47, 48} , ANG 2 (Asante NaTRIUM Green 2) ^{13, 49} und SBFI. ⁸	55
Tab. 3: Absorptions- und Emissionsmaxima der [2.1.1]-Farbstoffstrukturen 64, 49, 48, 45 und 43.	76
Tab. 4: Eigenschaften der Diaza-[15]Krone-5-Xanthen-Derivate 13, 12, 19, 17 und des [2.1.1]-Xanthen-Derivats 42.....	95

7.4 Lebenslauf

Name: Rainer Strathausen
Geburtsdatum: 28.11.1985
Geburtsort: Heilbad Heiligenstadt

AUSBILDUNG

Seit 09/2010 **Promotion**, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
08/2010 **Diplom**, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
Thema der Diplomarbeit: Synthese von Hexaazapentacenen durch oxidative *ortho*-Anellierung
10/2005 – 08/2010 **Studium der Chemie**, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
10/2004 – 06/2005 **Wehrdienst**
08/1996 – 06/2004 **Lingemann Gymnasium**, Heiligenstadt, Deutschland

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

Seit 09/2010 **Promotionsstudent** an der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät, Universität Jena und **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** in der Arbeitsgruppe für Biomolekulare Photonik, Universitätsklinikum Jena
10/2009 – 08/2010 **Diplom-Student** in der Arbeitsgruppe Beckert, Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Universität Jena
11/2009 – 12/2009 **Studentischer Mitarbeiter** der Arbeitsgruppe Beckert, Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Universität Jena
11/2008 – 12/2009 **Studentischer Mitarbeiter** der Arbeitsgruppe Rau, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Universität Jena

PUBLIKATIONEN

Strathausen R, Beckert R, Fleischhauer J, Müller D, Görls H, Novel Dihydropyrazines and their Double *ortho*-Annulation to Hexaazapentacenes, Z. Naturforsch. **2014**, *69b*, 641 – 649

Habenicht S, Schramm S, Zhu M, Freund RR, Langenstück T, **Strathausen R**, Weiß D, Biskup C, Beckert R, π -Extension of a 4-ethoxy-1,3-thiazole via aryl alkyne cross coupling: synthesis and exploration of the electronic structure, Photochem. Photobiol. Sci. **2015**, Sep 29.

POSTERBEITRÄGE

03/2011	International Symposium of the Thuringian ProExcellence Initiative NanoConSens, Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Jena, Deutschland
---------	---

Ort, Datum

Unterschrift

8 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Christoph Biskup, für das interessante und vielschichtige Thema, aber auch die Hinweise, Diskussionen, die stetige Hilfsbereitschaft bei der Bearbeitung meines Themas und den Freiraum, eigene Ideen zu verfolgen.

Des Weiteren gilt mein Dank meinem zweiten Betreuer, Herrn Prof. Dr. Rainer Beckert, für die Hinweise, Diskussionen und die stetige Hilfsbereitschaft, besonders was Chemikalien Geräte und Analytik betrifft. Besonders die Möglichkeit, an seinen Arbeitsgruppen-Seminaren teilzunehmen und immer mal wieder unter Chemikern zu sein, war sehr hilfreich.

PD Dr. Dieter Weiß danke ich für die Hinweise, Diskussionen, die praktische Hilfe bei chemischen Fragestellungen sowie die Korrektur der Arbeit.

Dr. Birgit Hoffmann und Frau Ines Neubauer danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

PD Dr. Reimar Krieg danke ich für die Hinweise und Diskussionen über Fluoreszenzfarbstoffe und die erhaltenen Ausgangsstoffe für die Styrylfarbstoffe.

Für praktische Hinweise zur Einrichtung des Labors und Diskussionen zur Arbeit danke ich Dr. Eric Täuscher. Am Ende waren es doch keine Thiazole!

Herrn Dr. Günther, Herrn Dr. Bellstedt und Frau Sentis danke ich für die Aufnahme der oft komplizierten NMR-Spektren.

Für das Messen der zahlreichen MS und HR-MS Spektren möchte ich Herrn Dr. Poppitz, Frau Heineck und Frau Schöнау danken.

Herrn Dr. Görls danke ich für die Bestimmung der Kristallstrukturanalysen.

Frau Lentvogt möchte ich für das Messen der Elementaranalysen danken.

Annett Wiesenburg möchte ich für die Vorbereitung der Zellen und Dr. Birgit Hoffmann für die gemeinsame Durchführung der Zellexperimente am Mikroskop danken.

Ich möchte den gesamten aktuellen und ehemaligen Kollegen der AG Biomolekulare Photonik, also Franziska Förtsch, Teresa Langenstück, Christoph Biskup, Birgit Hoffmann, Sarmiza Stanca, Christian Melle, Annett Wiesenburg, Cathrin Bayer, Kathrin

Danksagung

Groeneveld und Ines Neubauer für die freundschaftliche und familiäre Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die schönen Ablenkungen von der Arbeit danken.

Für die besondere Atmosphäre, Gespräche und Diskussionen im Büro möchte ich mich besonders bei Franziska Förtsch, Teresa Langenstück, Cathrin Bayer und Kathrin Groeneveld bedanken.

Meinen Kollegen im Labor, die molekularbiologisch gearbeitet haben, möchte ich für ihre große Toleranz und Rücksichtnahme danken. Ganz ließen sich leider unangenehme und tränenreizende Gerüche, was die Chemie so mit sich bringt, nicht vermeiden.

Ich möchte mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern meiner „Zweiterarbeitsgruppe“, der AG Beckert, für die praktische Hilfe (ich war häufiger zum „borgen“ da), die sinnvollen, weniger sinnvollen, ernsthaften und weniger ernsthaften Diskussionen sowie den Ablenkungen von der Arbeit bedanken. Ich danke u.a. Anja Darsen, Angelika Güther, Dominique Gampe, Martin Kaufmann, Stefan Ehrhardt, Dörthe Jakobi, Stefanie Habenicht, Stefan Schramm, Dr. Lorena Katalina Canderón-Ortiz, Dr. Kevin Stippich, Dr. Roberto Menzel, Svenja Herzog, Dr. Susan Klimas, Dr. Hendryk Würfel, Sylke Kaiser und Dr. Dieter Weiß.

Für die Mittagsrunden mit wechselnder Besetzung und interessanten Diskussionen möchte ich mich bei Teresa Langenstück, Axel R. Göhring, Birgit Hoffmann und Christoph Biskup bedanken.

Ich danke Florian Kretschmer, Christian von der Ehe Tobias Janoschka, Lutz Tauhardt und Silvio Preußner für die gemeinsamen Abende, Wanderungen und Fahrradtouren.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, meiner Familie und meiner Freundin, die mich während der gesamten Promotionszeit unterstützt haben.